

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA MACHADO PEREIRA

**EFEITO DO TRATAMENTO PROLONGADO COM ÁCIDO GÁLICO
EM ANIMAIS DIABÉTICOS: UMA ABORDAGEM COMPORTAMENTAL
E NEUROPROTETORA**

CURITIBA

2016

MARIANA MACHADO PEREIRA

**EFEITO DO TRATAMENTO PROLONGADO COM ÁCIDO GÁLICO
EM ANIMAIS DIABÉTICOS: UMA ABORDAGEM COMPORTAMENTAL
E NEUROPROTETORA**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná, como requisito
parcial à obtenção do título de bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Janaina Menezes
Zanoveli

Coorientadora: Ma. Helen de Moraes

CURITIBA

2016

Agradecimentos

Aos meus pais, pelos seus ensinamentos, apoio incondicional e suporte que me deram durante toda a vida e principalmente durante a graduação nos meus momentos de mais cansaço e dúvidas, vocês foram a base para eu ter chegado até aqui.

À minha orientadora, profa. Janaina, por ter me deixado fazer parte do seu grupo de pesquisa, por todo seu conhecimento transmitido, incentivo, ideias, sugestões e entusiasmo com meu projeto. Sua orientação foi fundamental e fez toda a diferença para que eu chegasse ao final deste trabalho.

À minha coorientadora, Helen, por estar sempre presente e auxiliando em todas as etapas deste trabalho, por tirar todas as minhas dúvidas pessoalmente ou por qualquer outro meio de comunicação que a tecnologia pode proporcionar, pelos ensinamentos, ideias e conselhos e por passar todas as dicas necessárias para se trabalhar no departamento de farmacologia.

À Paula, que esteve junto comigo desde o início do trabalho, pelos conselhos, conversas, apoio e ajuda durante todas as etapas, principalmente aquelas mais difíceis.

À profa. Alexandra Acco e suas alunas, em especial à Cláudia e Eliana, que cederam espaço em seu laboratório de Farmacologia e Metabolismo e colaboraram para que fossem feitas as análises de resultados importantes obtidos neste trabalho.

À Débora, Karin, Sze e Isadora, pela amizade, incentivo e apoio durante todos os anos da graduação.

A *monsieur* Jadson, pela amizade, incentivo e paciência por aguentar tantas mudanças de humor e conversas sobre a monografia quando eu deveria ter perguntado sobre outra coisa.

Aos meus familiares que tantas vezes fui obrigada a me privar de momentos junto para me dedicar a estudos e leituras.

À Biju e Lilica, por me fazerem rir sempre naqueles momentos mais difíceis em que eu achava que isso não era possível.

Agradeço também a todos do departamento de farmacologia da Universidade Federal do Paraná e também aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

Estudos demonstram que há uma associação entre o diabetes e psicopatologias como a ansiedade e a depressão, sugerindo uma relação bidirecional entre essas doenças. Sabe-se que o tratamento da depressão/ansiedade em indivíduos diabéticos é feito com drogas antidepressivas e este é um grande desafio por apresentar uma baixa taxa de adesão e efetividade além de muitos efeitos adversos. Desta forma, a busca por um tratamento que seja altamente eficaz para essas doenças é de extrema importância. É interessante destacar que tanto no diabetes como na ansiedade/depressão o estresse oxidativo está aumentado em diferentes tecidos, o que torna o ácido gálico, um composto antioxidante, interessante para se estudar. Assim, no presente estudo foi avaliado o efeito do tratamento crônico com ácido gálico (gavagem) nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg em animais diabéticos (DBT) submetidos aos testes de labirinto em cruz elevado (LCE) e de transição claro/escuro (TCE) (testes de ansiedade), natação forçada modificado (TNF) (teste de depressão) e campo aberto (TCA) (teste de atividade locomotora). Também foram avaliados no hipocampo (HIP) e córtex pré-frontal (CPF) parâmetros indiretos de estresse oxidativo, níveis de peroxidação lipídica (LPO) e glutathiona reduzida (GSH). Os resultados mostraram que os animais diabéticos possuem um comportamento do tipo ansiogênico e depressivo mais pronunciado do que os animais normoglicêmicos (NGL), além de terem um aumento em seu estresse oxidativo. O tratamento com ácido gálico na dose de 10 mg/kg foi capaz de produzir um efeito ansiolítico aumentando o tempo de permanência do animal no compartimento claro (TCE) e braços abertos (LCE), além de promover diferenças significativas nos parâmetros etológicos avaliados no LCE (aumento do tempo de exploração do final dos braços abertos e número de afundamentos da cabeça). No entanto, o ácido gálico em todas as doses utilizadas não foi capaz de induzir um efeito antidepressivo nos animais tratados que apresentaram maior frequência de imobilidade e menor frequência de natação e escalada no TNF, comportamento semelhante ao animal diabético tratado com veículo. Porém, o efeito antioxidante e neuroprotetor deste composto foi observado na dose de 10 mg/kg. O tratamento com esta dose levou a uma diminuição do nível de LPO e aumento de GSH no HIP e CPF dos animais tratados diferentemente do que foi observado nos animais DBT. Portanto, os resultados obtidos indicam que o ácido gálico foi capaz de induzir um efeito ansiolítico e antioxidante nos animais diabéticos fornecendo mais um indício da importância de se estudar e compreender os efeitos do estresse oxidativo na fisiopatologia das psicopatologias relacionadas ao diabetes.

Palavras-chave: Diabetes. Ácido Gálico. Ansiedade. Depressão. Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

Studies show that there is an association among diabetes and psychopathologies as anxiety and depression, suggesting a bidirectional relationship among these diseases. It is known that the treatment of depression/anxiety in diabetic patients is done with antidepressants and this is a big challenge due to their low rate of adherence and effectiveness besides many side effects. Thus, the seeking for a treatment that is highly effective for these diseases is of utmost importance. It is interesting to note that in diabetes as in anxiety/depression oxidative stress is increased in different tissues, which makes gallic acid, an antioxidant compound, interesting to study. Therefore, in this study were evaluated the effects of chronic treatment with gallic acid in doses of 10, 20 and 40 mg/kg (gavage) in diabetic animals (DBT) submitted to the elevated plus-maze (EPM) and the light-dark transition test (LDT) (anxiety tests), modified forced swim test (FST) (depression test) and open field test (OFT) (locomotor activity test). Also there were evaluated in the hippocampus (HIP) and prefrontal cortex (PFC) indirect parameters of oxidative stress, levels of lipid peroxidation (LPO) and reduced glutathione (GSH). The results showed that the diabetic animals have an anxiogenic-like and depressive-like behavior more pronounced than the normoglycemic animals (NGL), besides having an increase in their oxidative stress. Treatment with gallic acid at a dose of 10 mg/kg was able to produce an anxiolytic effect increasing time spent by the animals in the lit compartment (LDT) and open arms (EPM), besides promoting significant differences in the ethological parameters evaluated in EPM (increase in end open arm exploration and number of head dips). However, gallic acid in all doses was not able to induce an antidepressant effect in treated animals that showed higher frequency of immobility and lower frequency of swimming and climbing in the FST, behavior similar to diabetic animals treated with vehicle. Nevertheless, the antioxidant and neuroprotective effect of this compound was observed at a dose of 10 mg/kg. Treatment with this dose resulted in a decrease in the LPO level and increased GSH in the HIP and PFC of treated animals different from what was observed in DBT animals. Therefore, the results indicate that the gallic acid was able to induce an anxiolytic and antioxidant effect in diabetic animals providing further evidence of the importance of studying and understanding the effects of oxidative stress in the pathophysiology of psychopathologies associated with diabetes.

Key words: Diabetes. Gallic Acid. Anxiety. Depression. Oxidative Stress.

LISTA DE SIGLAS

5-HT – Serotonina

AG – Ácido Gálico (3,4,5, ácido trihidroxibenzóico)

CPF – Córtex Pré-Frontal

DBT – Animais diabéticos

DBT-AG10 – Animais diabéticos tratados com o ácido gálico na dose de 10 mg/kg

DBT-AG20 - Animais diabéticos tratados com o ácido gálico na dose de 20 mg/kg

DBT-AG40 - Animais diabéticos tratados com o ácido gálico na dose de 40 mg/kg

DBT-FLX – Animais diabéticos tratados com fluoxetina na dose de 10 mg/kg

DBT-VEH – Animais diabéticos tratados com veículo salina

DM – Diabetes *Mellitus*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

ERNs – Espécies reativas de nitrogênio

ERONs – Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FLX – Flouxetina

GSH – Glutathiona Reduzida

HIP – Hipocampo

LCE – Teste de Labirinto em Cruz Elevado

LPO – Peroxidação Lipídica

NGL – Animais normoglicêmicos

NGL-VEH – Animais normoglicêmicos tratados com veículo salina

SNC – Sistema Nervoso Central

STZ – Estreptozotocina

TCA – Teste de Campo Aberto

TCE – Teste de Transição Claro-Escuro

TNF – Teste de Natação Forçada Modificado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 OBJETIVOS	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 ANIMAIS	18
3.2 DROGAS E TRATAMENTO	19
3.3 INDUÇÃO DO DIABETES	19
3.4 TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	20
3.5 TESTE DE TRANSIÇÃO CLARO-ESCURO	20
3.6 TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADO	21
3.7 TESTE DE CAMPO ABERTO	22
3.8 PREPARAÇÃO DE FRAÇÕES SUBCELULARES DE CÉREBRO	22
3.9 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)	22
3.10 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO)	23
3.11 TESTE DE DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)	23
3.12 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	24
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
4 RESULTADOS	25
4.1 TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	25
4.2 TESTE DE TRANSIÇÃO CLARO-ESCURO	27
4.3 TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADO	28

4.4 TESTE DE CAMPO ABERTO	29
4.5 GLICEMIA E GANHO DE PESO	30
4.6 ESTRESSE OXIDATIVO	31
4.6.1 Peroxidação lipídica	31
4.6.2 Glutathiona reduzida	32
4.6.3 Teste de DPPH	33
5 DISCUSSÃO	34
5.1 ANSIEDADE	35
5.2 DEPRESSÃO	39
5.3 ATIVIDADE LOCOMOTORA	40
5.4 GANHO DE PESO E GLICEMIA	41
5.5 ESTRESSE OXIDATIVO	42
6 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* (DM) é um transtorno metabólico heterogêneo e crônico caracterizado pela elevação da glicemia sanguínea (hiperglicemia) resultante da falha na secreção ou ação de insulina ou ambos (ROWLAND & BELLUSH, 1989; IDF, 2015). Além disso, apresenta complicações micro e macrovasculares acometendo tecidos facilmente permeáveis à glicose, ocasionando várias comorbidades como nefropatias, doenças cardiovasculares, retinopatias, entre outras complicações crônicas e severas. (ANDERSON et al., 2001; GIACCO & BROWNLEE, 2010; HO et al., 2011).

Estudos demonstram que psicopatologias como a ansiedade e a depressão também estão associadas ao diabetes e a hiperglicemia parece ter um papel fundamental na fisiopatologia dessas comorbidades psiquiátricas (KAMEI et al., 2003; WRIGHTEN et al., 2008). Foi demonstrado que, por diferentes mecanismos, a hiperglicemia provoca danos que levam a um aumento do estresse oxidativo acarretando além de alterações hormonais, alterações nos sistemas de neurotransmissores que regulam os comportamentos associados a doenças neuropsiquiátricas como a depressão e ansiedade (BAMBOLKAR & SAINANI, 1995; BABURAO & ANAND, 2012; DE MORAIS et al., 2014; DIPNALL et al., 2015). Além disso, há estudos que sugerem uma relação bidirecional entre essas doenças e o diabetes. Assim, o diabetes por diferentes mecanismos que ainda não estão bem estabelecidos, pode aumentar a prevalência ou antecipar o surgimento da ansiedade e depressão e vice-versa. Estes transtornos além de possuírem uma maior prevalência em diabéticos quando comparado aos indivíduos normoglicêmicos, aumentam a morbidade da doença causando prejuízos significativos para o indivíduo e para a sociedade (GOLDEN et al., 2008; COLLINS et al., 2009; EGEDE, 2010; RENN et al., 2011; DE MORAIS et al., 2014; ZANOVELLI et al., 2016).

Agravando ainda mais a condição da ansiedade/depressão associada ao diabetes, sabe-se que o tratamento com drogas antidepressivas representa um grande desafio por apresentar uma baixa taxa de adesão e efetividade além de muitos efeitos adversos (ERENMEMISOGLU et al., 1999; LITTLE, 2009). Por este motivo, a busca pelo

entendimento fisiopatológico dessa associação, aliado a busca por um tratamento que seja altamente eficaz para essas doenças e o diabetes é de extrema importância.

Tendo em vista o aumento do estresse oxidativo decorrente da hiperglicemia, o uso de antioxidantes pode ser uma alternativa de tratamento eficaz para o diabetes em si, bem como de suas complicações associadas, como as psicopatologias. Interessante que estudos relatam que o composto polifenólico ácido gálico (3,4,5, ácido trihidroxibenzóico), considerado um neuroprotetor devido ao seu efeito antioxidante (KADE & ROCHA, 2013), induz um efeito antidepressivo e ansiolítico em animais (CHHILLAR & DHINGRA, 2012; MANSOURI et al., 2013; PRINCE et al., 2010). Em relação à condição diabética, há relatos de que o tratamento com ácido gálico em animais diabéticos auxilia no controle da glicemia (LATHA & DAISY, 2011; PUNITHAVATHI et al., 2011; STANELY et al., 2011). Entretanto, apesar de alguns estudos indicarem que o ácido gálico é eficaz em comportamentos relacionados com a depressão e ansiedade, ainda não há nenhum estudo que investigou o efeito deste tratamento sobre respostas comportamentais relacionadas com a depressão e a ansiedade em animais diabéticos.

Deste modo, considerando que o aumento da prevalência de psicopatologias em pacientes diabéticos seja uma consequência da hiperglicemia e de mudanças bioquímicas como o estresse oxidativo, o presente estudo teve como objetivo investigar o possível efeito do tratamento crônico com o ácido gálico em animais com o diabetes induzido quimicamente pela injeção de estreptozotocina (STZ; SZKUDELSKI, 2001) submetidos a testes comportamentais relacionados com a depressão e a ansiedade. Para isto, foram empregados os testes de natação forçada modificado (PORSOLT et al., 1979; CRYAN et al., 2002) para análise do comportamento do tipo depressivo, labirinto em cruz elevado (PELLOW et al., 1985) e transição claro e escuro (VICENTE & ZANGROSSI, 2014) para análise do comportamento do tipo ansioso e teste de campo aberto para análise da atividade locomotora dos animais. Ademais, nos mesmos foram avaliados parâmetros de estresse oxidativo no hipocampo (HIP) e córtex pré-frontal (CPF), áreas cerebrais associadas a comportamentos emocionais. A glicemia e o peso dos animais foram medidos com a finalidade de se estudar parâmetros relacionados com a própria condição do diabetes.

1.1 OBJETIVOS

- OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do tratamento crônico com ácido gálico (doses de 10, 20 e 40 mg/kg) em modelo animal de diabetes induzido pela estreptozotocina (modelo de diabetes tipo 1) sobre as respostas comportamentais relacionadas à ansiedade, depressão e atividade locomotora.

- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o comportamento relacionado com a ansiedade em animais diabéticos submetidos aos testes de labirinto em cruz elevado e teste de transição claro-escuro.
- Avaliar o comportamento relacionado com a depressão e locomoção em animais diabéticos submetidos ao teste de natação forçada e de campo aberto, respectivamente.
- Avaliar em animais diabéticos o efeito do tratamento crônico com ácido gálico sobre todos os parâmetros comportamentais - ansiedade, depressão e locomotor.
- Avaliar o efeito do tratamento crônico com ácido gálico, sobre parâmetros relacionados com a condição diabética – peso corpóreo e glicemia em animais diabéticos.
- Avaliar o efeito do tratamento crônico com ácido gálico sobre parâmetros indiretos de estresse oxidativo (determinação do nível de glutathione reduzida e peroxidação lipídica) no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos diabéticos e também normoglicêmicos.
- Avaliar a ação antioxidante do ácido gálico através do teste de DPPH.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O diabetes é um distúrbio metabólico que resulta em uma doença progressiva e crônica caracterizada principalmente pela hiperglicemia, ou seja, pelas concentrações elevadas de glicose no sangue (LATHA & DAISY, 2011). Ele ocorre com diferentes prevalências entre os países, porém a Federação Internacional do Diabetes (IDF, 2015) estima que há aproximadamente 415 milhões de pessoas diabéticas no mundo, sendo que esse número pode chegar a 642 milhões de pessoas com a doença em 2040. Sabe-se que a hiperglicemia, característica da doença, pode ocorrer devido a uma deficiência de insulina resultante de uma ação autoimune que leva a destruição das células β (beta) pancreáticas (diabetes tipo 1), ou devido a uma resistência à insulina ou a um comprometimento na secreção da mesma (diabetes tipo 2) (RANG et al., 2012). A falta de insulina pode levar a distúrbios no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos levando a sérias complicações secundárias como doença arterial coronária, falência renal, acidente vascular cerebral, cegueira e neuropatias (LATHA & DAISY, 2011). Assim, quando não tratado de forma correta, o diabetes pode vir a ocasionar sérios danos à saúde do paciente, pois ele também está associado com mudanças patológicas no sistema nervoso central (SNC) que levam a defeitos cognitivos e ao aumento no risco de outras complicações cerebrais (BIESSELS & GISPEN, 2005).

O quadro decorrente de hiperglicemia acarreta além de alterações hormonais e nos sistemas de neurotransmissores, danos em áreas encefálicas importantes que regulam os comportamentos emocionais, tais como o hipocampo e córtex pré-frontal (BAMBOLKAR & SAINANI, 1995; BABURAO & ANAND, 2012; DE MORAIS et al., 2014; DIPNALL et al., 2015). Tendo em vista essas alterações, muitos estudos demonstram que o DM está associado não somente com danos físicos, mas também com algumas comorbidades psiquiátricas como a depressão e a ansiedade. Estudos pré-clínicos relatam que, em comparação com animais normoglicêmicos, há um comportamento mais pronunciado do tipo depressivo, e também do tipo ansiogênico, em camundongos e ratos diabetizados por uma injeção de estreptozotocina (modelo de diabetes tipo 1). Estes animais apresentaram um tempo de imobilidade bem maior quando foram avaliados nos testes de suspensão pela cauda e natação forçada, além de apresentarem um efeito facilitador sobre o desempenho de esquivas inibitórias, indicativo de uma resposta ansiogênica, no teste do Labirinto em T elevado (GOMEZ & BARROS, 2000; WAYHS et

al., 2010; HO et al., 2012; DE MORAIS et al., 2014, GUPTA et al., 2014; DA SILVA et al., 2015; GAMBETA et al., 2015). Desta forma, o diabetes por diferentes mecanismos, ainda não bem estabelecidos, parece ser um facilitador para aumentar a prevalência ou antecipar o surgimento da ansiedade e depressão, assim como, a depressão/ansiedade podem levar ao desenvolvimento do diabetes, como tem sido sugerido (GOLDEN et al., 2008; COLLINS et al., 2009; RENN et al., 2011; ZANOVELI et al., 2016).

A depressão é uma das doenças psiquiátricas mais comuns atualmente de acordo com o DSM-V feito pela associação psiquiátrica americana (*“Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders”*, APA, quinta edição, 2013). Dentre seus sintomas pode-se listar a anedonia, tristeza, dificuldades de concentração, alteração de peso e problemas psicomotores. Estudos clínicos relatam uma alta incidência do diabetes em pacientes com depressão (BROWN et al., 2004; GOLDEN et al., 2008; GRAGNOLI, 2014); assim como uma alta prevalência de depressão entre os pacientes diabéticos (ANDERSON et al., 2001; CLAVIJO et al., 2006; NICOLAU et al., 2013; MAIA et al., 2014; DIPNALL et al., 2015; MIR et al., 2015). Outros estudos mostram que a prevalência da depressão é até duas vezes maior em pacientes diabéticos quando comparados com a população geral (ANDERSON et al., 2001; ROY & LLOYD, 2012).

De acordo com Castillo (2000), a ansiedade é uma emoção cujo o estado de apreensão é constante, caracterizado por desconforto ou tensão derivado de antecipação de perigo, de algo estranho ou desconhecido, geralmente acompanhada de ativação autonômica. A ansiedade é considerada normal enquanto uma resposta adaptativa frente a situações ameaçadoras, sendo essencial para a sobrevivência das espécies, pois prepara o indivíduo para evitar uma ameaça ou atenuar suas consequências. No entanto, quando a resposta a um determinado estímulo é inadequada, ou seja, mal adaptativa, seja por sua duração e/ou intensidade exagerada causando sofrimento ao indivíduo e prejuízo no desempenho de tarefas as mais diversas, esta ansiedade passa a ser reconhecida como uma ansiedade patológica. Assim, segundo o DSM-V (2013), há diferentes tipos de transtornos de ansiedade, dentre estes o transtorno de ansiedade generalizada, que é um dos mais prevalentes na população em geral. Estudos relatam que 40% dos pacientes diabéticos apresentam um aumento

de sintomas relacionados à ansiedade (GRIGSBY et al. 2002; LIN et al. 2008). Neste sentido, de acordo com Maia e colaboradores (2014) a prevalência dos sintomas de ansiedade em pacientes com diabetes do tipo 1 é consideravelmente maior do que na população geral chegando a 60%. Sendo assim, existem indícios de que a incidência de transtornos de ansiedade é maior entre pacientes diabéticos (GRIGSBY et al. 2002; CLAVIJO et al. 2006).

A neurobiologia dessas psicopatologias - ansiedade e depressão - relacionada ao diabetes ainda é pouco entendida. Porém, estudos sugerem que o aumento do estresse oxidativo, resultante da hiperglicemia, pode contribuir para o desenvolvimento dessas doenças (BAMBOLKAR & SAINANI, 1995; BABURAO & ANAND, 2012; DE MORAIS et al., 2014; DIPNALL et al., 2015). Deste modo, a hiperglicemia parece ter um papel importante na fisiopatologia dessas comorbidades psiquiátricas associadas ao DM (KAMEI et al., 2003; WRIGHTEN et al., 2008). Giacco e Brownlee (2010) sugerem que por meio de diferentes mecanismos a hiperglicemia decorrente do diabetes provoca danos teciduais como o aumento do fluxo de glicose e outros açúcares, o aumento da formação intracelular de produtos finais de glicação avançada, o aumento da expressão do receptor para produtos finais de glicação avançada e seus ligantes ativadores, ativação de isoformas da proteína quinase C (PKC) e hiperatividade da via hexosamina. Muitas evidências apontam que todos estes mecanismos decorrentes da hiperglicemia contribuem para um aumento significativo do estresse oxidativo (NAUDI et al., 2012; DE CARVALHO et al., 2012).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) são produzidas normalmente durante o metabolismo basal das células. Assim, em condições normais, existem enzimas no organismo que possuem ação antioxidante contra essas espécies reativas e estas enzimas então corrigem até 99% dos danos causados pelo desequilíbrio na produção de EROs e/ou ERNs. (HALLIWELL, 2001). Alguns desses agentes antioxidantes podem ser classificados em enzimáticos, dentre os quais se destacam a enzima catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), e não enzimáticos como a glutathiona reduzida (GSH) (VALKO et al., 2007). O GSH é um indicador de estresse

oxidativo bem conhecido (DADHEECH et al., 2008), sendo o mais abundante antioxidante do sistema nervoso central (ROBERT et al., 2014).

Já o estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre a geração de EROs/ERNs e enzimas antioxidantes, culminando em um aumento dessas espécies reativas. Este desequilíbrio pode interferir em muitos mecanismos e na função de várias macromoléculas (MADRIGAL et al., 2006). Além disso, ele induz a um aumento da concentração intracelular de moléculas altamente reativas que provocam quebras no ácido desoxirribonucleico (DNA) além de danos à membrana celular e à estrutura proteica das células como a peroxidação lipídica (LPO). (SIES, 1997; VALKO et al., 2007). A LPO pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos que provoca a oxidação de lipídios poli-insaturados que estão presentes nas membranas celulares. As suas principais consequências são as alterações na estrutura e na permeabilidade da membrana. Essas alterações podem levar à destruição da estrutura celular e alteração dos mecanismos de troca de metabólitos além de promover a liberação do conteúdo das organelas e formação de produtos citotóxicos que em uma condição extrema podem levar à morte celular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; DAL-PIZZOL et al., 2000). Estes tipos de danos quando causados em neurônios podem gerar encefalopatias e consequentemente transtornos psiquiátricos (MAES et al., 2000; TSUBOI et al., 2006; VALKO et al., 2007, BEHR et al., 2012).

Cabe ressaltar que o encéfalo está mais propenso aos danos ocasionados pelo estresse oxidativo, já que ele é um órgão que necessita de um alto consumo de oxigênio além de ser rico em ácidos graxos poli-insaturados oxidáveis e pobres em enzimas antioxidantes. (VALKO et al., 2007; WANG & MICHAELIS, 2010). É importante salientar que áreas do sistema límbico que estão envolvidas na fisiopatologia da depressão e ansiedade, como o hipocampo e córtex pré-frontal, são afetadas por esse desequilíbrio (BREMNER et al., 2002; SAVITZ et al., 2009; INNOS et al., 2013). Em consequência disto, muitos estudos estão sendo feitos para se descobrir um tratamento que seja efetivo para evitar os danos e os sintomas provocados pelo diabetes e também pela depressão e ansiedade associadas a ele. Sabe-se que a manutenção do controle da glicemia é um fator fundamental para prevenir os efeitos do diabetes no SNC e outros órgãos que

também são afetados por essa doença. Entretanto, como um rigoroso controle glicêmico não é sempre alcançado clinicamente, os antidepressivos ainda são considerados como a primeira escolha para o tratamento da depressão/ansiedade associada ao diabetes (SPIS et al., 1995; RUBIN et al., 2004; RUSTAD et al., 2011). Porém, há evidências demonstrando que os antidepressivos não são tão eficazes. Apenas 30% dos pacientes tratados respondem efetivamente ao tratamento e mesmo assim, este requer uma terapia contínua, que pode variar de semanas a meses, para se obter um resultado positivo (FAVA et al., 1996; LITTLE, 2009). Ademais, alguns antidepressivos podem afetar a glicose no plasma e os níveis de insulina além de interagir com as drogas hipoglicemiantes (ERENMEMISOGLU, 1999). Como os mecanismos envolvidos na patofisiologia da relação entre o diabetes, a depressão e a ansiedade ainda não estão completamente esclarecidos, o seu entendimento se torna necessário e urgente para ajudar na busca por tratamentos mais eficazes.

Existem estudos demonstrando que o tratamento com antioxidantes pode induzir efeitos antidepressivos e ansiolíticos (BINFARÉ et al., 2009; LOBATO et al., 2010; GAUTAM et al., 2012). Neste sentido, o composto antioxidante polifenólico, 3,4,5, ácido trihidroxibenzóico, denominado como ácido gálico (CHHILLAR & DHINGRA, 2012), pode desempenhar um papel importante e benéfico no tratamento dessas comorbidades psiquiátricas associadas ao diabetes. Ele é encontrado em plantas como o carvalho, e frutos como uvas, castanhas, manga e nozes bem como no chá verde e vinho tinto (PRINCE et al., 2010; MANSOURI et al., 2013). O ácido gálico possui diferentes propriedades, tais como anti-inflamatórias, anti-angiogênicas, antimicrobianas, anticancerígenas e antioxidantes. Além disso, ele também apresenta um potencial efeito em distúrbios metabólicos como o diabetes, nas patologias de transtornos de humor como a depressão, e na ansiedade (LU et al., 2006; PUNITHAVATHI et al., 2011; STANELY et al., 2011; CHHILLAR & DHINGRA, 2012; VERMA et al., 2013; CHOUBEY et al., 2015). Assim, estudos com animais relatam que o tratamento com o ácido gálico foi capaz de melhorar comportamentos relacionados com a depressão e a ansiedade (CHHILLAR & DHINGRA, 2012; MANSOURI et al., 2014; MOGHADAS et al., 2016), além de apresentar um efeito neuroprotetor (KADE & ROCHA, 2013; MANSOURI et al., 2013). Mais ainda, estudos realizados com ratos diabéticos tratados com ácido gálico,

mostraram que o tratamento com este composto foi capaz de reduzir de forma significativa os níveis de glicose no sangue desses animais (PUNITHAVATHI et al., 2011; STANELY et al., 2011). Em outro estudo, realizado por Latha e Daisy (2011), os animais diabéticos também foram tratados com o ácido gálico e observou-se que esse tratamento além de reduzir os níveis de glicose sanguínea nesses animais, quando comparados a animais não diabéticos, também ocasionou um aumento em seu peso e um aumento na sua insulina plasmática.

Diante disso, neste trabalho foi avaliado o efeito do tratamento crônico com ácido gálico em diferentes doses (10, 20 e 40 mg/kg) em animais diabéticos submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado (LCE) e de transição claro/escuro (TCE) (testes de ansiedade), teste de natação forçada modificado (TNF) (teste de depressão) e campo aberto (TCA) (teste para avaliação da atividade locomotora). Foi também avaliado no hipocampo e córtex pré-frontal, áreas encefálicas implicadas na depressão/ansiedade, parâmetros indiretos de estresse oxidativo (níveis de GSH e LPO). Ademais, o teste de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi feito para corroborar a propriedade antioxidante deste composto.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados Ratos machos Wistar, com peso entre 180 – 220g no início do experimento, fornecidos pelo biotério da Universidade Federal do Paraná. Os animais tiveram livre acesso a água e alimento e foram mantidos sob um ciclo de luz claro/escuro de 12 h (7:00 às 19:00 h) e temperatura controlada em $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Todos os experimentos foram conduzidos em acordo com as normas e legislações contidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UFPR (CEUA 959).

3.2 DROGAS E TRATAMENTO

Foram utilizadas as seguintes drogas provenientes das fontes indicadas: estreptozotocina (STZ, Santa Cruz Biotechnology Inc., EUA); citrato de sódio (Merck S.A, Brasil), polifenol 3,4,5, ácido trihidroxibenzóico (ácido gálico – AG; Sigma, USA) e fluoxetina (FLX - SEM Sigma Pharma Ltda, Brasil). A STZ foi diluída em tampão citrato 10 mM, pH 4,5 e administrada por via intraperitoneal (i.p.) na dose de 60 mg/kg. O AG foi dissolvido em salina estéril e tween (uma gota) e administrada por via oral (gavagem) na dose de 10, 20 e 40 mg/kg (PUNITHAVATHI et al., 2011). A fluoxetina (10 mg/kg; via oral) foi utilizada como um controle positivo do efeito ansiolítico e antidepressivo e foi dissolvida em salina estéril. Todas as drogas foram preparadas imediatamente antes da aplicação e as suas doses foram retiradas de estudos prévios (CHHILLAR & DHINGRA, 2012; DE MORAIS et al., 2014; GUPTA et al., 2014; GAMBETA et al., 2015; DA SILVA et al., 2015; KURHE & MAHERSH, 2015).

3.3 INDUÇÃO DO DIABETES

A indução do diabetes foi realizada através da administração única de estreptozotocina (modelo de diabetes tipo 1) (STZ; 60mg/kg, intraperitoneal; diluído em tampão citrato, 10 mM, pH 4,5) em ratos previamente submetidos a jejum de 12 horas. A confirmação do diabetes foi realizada três dias após a injeção de STZ, por meio da aplicação de um pequeno volume de sangue periférico colhido da cauda dos animais em fitas teste impregnadas de glicose oxidase (Accu-Check Active™, Roche). Foram considerados diabéticos e mantidos nos experimentos os animais cuja glicemia foi igual ou maior que 250 mg/dL. Paralelamente, grupos controles normoglicêmicos foram conduzidos, os quais receberam somente tampão citrato (10 mM, pH 4,5, volume equivalente) (DE MORAIS et al., 2014).

3.4 TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Para avaliação do comportamento de ansiedade os animais foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado descrito por Pellow e colaboradores (1985). O aparato utilizado neste experimento é feito de madeira e fica elevado a 50 cm do chão. Ele possui 4 braços, sendo 2 abertos e 2 fechados sendo que, no cruzamento entre os braços, há uma área central de 10 cm². Para a realização desse teste foi utilizada uma iluminação de 40 lux. Os animais foram então colocados individualmente no centro do labirinto e por 5 minutos foram gravados os seus movimentos. Após as filmagens foi avaliado o tempo em que cada animal permaneceu nos braços abertos, bem como, o número de entradas nos braços fechados, sendo considerada a entrada quando o animal ultrapassar com as 4 patas as delimitações de cada braço, o tempo que o animal passa no final dos braços abertos (*end open arm exploration*) e a frequência de afundamento da cabeça nos braços abertos (*head dips*). O aparato foi limpo após cada teste com uma solução de álcool etílico à 5% e seco.

3.5 TESTE DE TRANSIÇÃO CLARO-ESCURO

Neste experimento, é utilizada uma caixa feita de madeira com as dimensões de 48 x 24 x 27 cm. Esta caixa é dividida por uma porta (10 x 10 cm) através da qual os animais podem atravessar os dois compartimentos que tem duas dimensões iguais (24 x 24 x 27 cm). Assim, um desses compartimentos é pintado de branco e iluminado com uma porção de luz de 40 lux e o outro pintado de preto e não iluminado.

Este teste também avalia o comportamento de ansiedade nos animais. Ele foi realizado de acordo com Vicente e Zangrossi (2014). Desta forma, durante o teste, os ratos foram colocados com a face voltada para a porta que separa os dois compartimentos. Logo após a primeira transição para o compartimento escuro da caixa, o comportamento do animal foi registrado por um período de 5 minutos, através de uma

câmera. Foi então quantificado o tempo total gasto pelo animal no compartimento claro e o número de transições entre os dois compartimentos. Ao término de cada sessão teste, a caixa foi limpa com uma solução de etanol à 5%.

3.6 TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADO

Este experimento avalia o comportamento do tipo depressivo nos animais (CRYAN et al., 2002). Ele é uma modificação do teste de Porsolt e colaboradores (1979). Assim, os animais foram colocados individualmente para nadar em cilindros de plástico (25 cm de diâmetro por 40 cm de altura contendo 30 cm de água na temperatura de $22\pm1^{\circ}\text{C}$) por 15 minutos (sessão pré-teste). Em seguida, os animais foram retirados e submetidos a secagem com panos limpos e secos em uma caixa separada antes de retornarem para suas caixas.

Vinte e quatro horas após a sessão de pré-teste, os animais foram submetidos a uma sessão de 5 minutos de nado forçado (sessão teste). Durante esta sessão, os comportamentos avaliados foram: imobilidade do animal (exceto pequenos movimentos necessários para flutuar), natação (movimentos através do cilindro de plástico) e escalada (movimento com as patas dianteiras na parede do cilindro na tentativa de sair do mesmo). A cada 5 segundos de intervalo da sessão teste, foi registrado o comportamento predominante: (1) imobilidade, (2) escalada ou (3) nado. Entre um animal e outro, foi repostada água limpa após o cilindro ser limpo adequadamente. Após cada sessão (pré-teste e teste), os animais foram removidos e submetido à secagem com panos limpos e secos em uma caixa separada antes de retornarem para suas caixas.

3.7 TESTE DE CAMPO ABERTO

Este teste foi utilizado para avaliar a atividade locomotora dos animais. Para isso, os animais foram colocados em uma arena retangular feita de madeira (50 cm de

comprimento, 50 cm de largura e 63 cm de altura), cujo assoalho é dividido em 9 seções. O número de cruzamentos entre essas seções e a frequência de levantamentos (*rearings*) (movimento em que o animal fica em pé sobre as suas patas traseiras) foram avaliados como parâmetro de atividade locomotora e exploratória do animal. Todos os animais (normoglicêmicos e diabéticos) foram avaliados em sessões experimentais no campo aberto por 5 minutos. O campo aberto foi cuidadosamente limpo após cada teste com uma solução de álcool etílico à 5% e seco (DE MORAIS et al., 2014).

3.8 PREPARAÇÃO DE FRAÇÕES SUBCELULARES DE CÉREBRO

O córtex pré-frontal e hipocampo de animais normoglicêmicos e diabéticos foram dissecados e homogeneizados em tampão de fosfato de potássio (0.1 M, pH 6,5) a uma diluição de 1:10. Uma parte deste homogeneizado foi usado para determinar os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e outra parte foi centrifugada a 9000g por 20 minutos e o seu sobrenadante foi usado para determinar os níveis de LPO.

3.9 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

Os níveis de GSH foram determinados como descrito por Sedlak e Lindsay (1968). 100 µl de homogenato foi separado e misturado com 80 µl de ácido tricloroacético a 12,5%. As amostras foram centrifugadas a 6.000 rpm (rotação por minuto) durante 15 min. Em uma microplaca de 96 poços, foram adicionados 20 µl do sobrenadante com 280 µl de Tris-HCl e 5 µl de 5,5-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) em metanol. Estas etapas foram realizadas com as amostras mantidas a 4°C, com gelo. A absorbância foi medida por espectrofotometria a 415 nm com um leitor de microplacas (BioTekSynergy HT, BioTek Instruments, Highland Park, VT, USA), e os valores foram interpolados em uma curva padrão de GSH (0,375-3 µg) e expressos como µg/g de tecido.

3.10 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO)

A LPO foi medida seguindo-se o método de FOX ou xilenol laranja descrito por Jiang e colaboradores (1991), com pequenas modificações. Este método quantifica a formação de hidroperóxidos durante a peroxidação lipídica. Ele é baseado no princípio de que hidroperóxidos oxidam ferro a íon férrico e por sua vez este íon se liga ao corante xilenol laranja. Primeiramente, 100 µl do sobrenadante foi suspenso em 100 µl de metanol, agitado no vórtex e centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos à 4°C. Depois, 100 µl do sobrenadante foi adicionado em 900 µl do reagente FOX2 (reagente de Wolff's; 4 mM de BHT, 250 mM de FeSO₄, 250 mM de H₂SO₄, e 100 mM de xilenol laranja). As amostras foram então agitadas no vórtex e incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. A absorbância foi lida a 560 nm utilizando um leitor de microplacas (BioTekSynergy HT, BioTek Instruments, Highland Park, VT, USA), e os valores expressos em [hidroperóxidos] nmoL. min⁻¹/ mg de tecido.

3.11 TESTE DE DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

O teste de DPPH é usado para avaliar a atividade de compostos para eliminar *in vitro* radicais livres, avaliando sua capacidade antioxidante. Assim, ele foi realizado para analisar se o ácido gálico e a flouxetina (utilizada como controle positivo) possuem propriedades antioxidantes.

Este teste foi realizado seguindo-se os protocolos descritos por Blois (1958) e Chen e colaboradores (2004), com pequenas modificações. Diferentes concentrações do ácido gálico e fluoxetina (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/ml) foram misturadas com a solução metanólica de DPPH. O ácido ascórbico (50 µg/ml) foi utilizado como controle positivo e água destilada como controle negativo. A absorbância foi medida a 517 nm utilizando-se um leitor de microplacas (BioTek Synergy HT, BioTek Instruments, Highland Park, VT, USA).

3.12 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após a confirmação da diabetização, os animais diabéticos foram divididos em 5 grupos:

Grupo 1 - animais tratados com o AG na dose de 10 mg/kg (DBT-AG10),

Grupo 2 - animais tratados com o AG na dose de 20 mg/kg (DBT-AG20),

Grupo 3 - animais tratados com o AG na dose de 40 mg/kg (DBT-AG40),

Grupo 4 - animais tratados com fluoxetina (DBT-FLX) na dose de 10 mg/kg e

Grupo 5 - animais tratados com veículo salina (DBT-VEH).

Um grupo de animais normoglicêmicos tratados com veículo (NGL-VEH) também foi feito, tendo-se um total de 6 grupos (n= 6 – 8/grupo).

Os testes comportamentais foram iniciados após 28-30 dias da indução do diabetes com a injeção de estreptozotocina (quarta semana). O tratamento crônico com AG (diferentes doses), fluoxetina ou veículo foi iniciado após 7 dias da diabetização durando 23 dias. Também foi avaliado, para controle positivo dos efeitos ansiolítico e antidepressivo, o efeito do tratamento prolongado com a fluoxetina. Os testes comportamentais foram realizados sempre uma hora após a administração das drogas - AG (em diferentes doses), fluoxetina ou veículo.

No 28º dia foi feito o teste do LCE e teste de TCE. No dia seguinte (29º dia), a sessão pré-teste do TNF foi realizada, sendo que no 30º dia foi realizado o teste de campo aberto seguido do TNF. Após o último teste, os animais foram eutanasiados e o hipocampo e córtex pré-frontal dissecados para as análises de parâmetros relacionados ao estresse oxidativo.

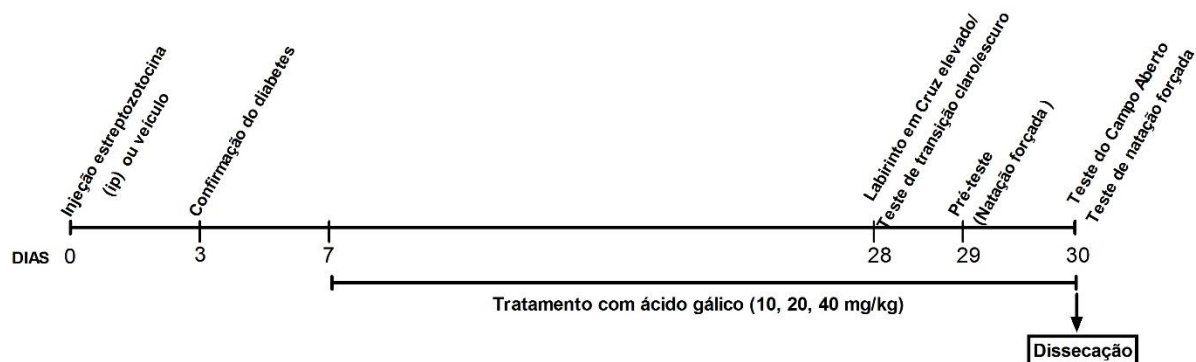


FIGURA 1. Delineamento Experimental.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene foram inicialmente utilizados para garantir que os dados satisfizessem os critérios para a realização de testes paramétricos. Quando os critérios foram aceitos, os resultados foram relatados como média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student a fim de avaliar se há diferença significativa entre o grupo de animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com veículo, e pela análise de variância (ANOVA) de uma via com os tratamentos (diferentes grupos de tratamento) como um único fator independente. Quando apropriados, testes de Newman-Keuls foram utilizados para análises *post-hoc*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O teste *t* de Student mostrou que animais diabéticos tratados com veículo possuem uma diminuição significativa de tempo de permanência nos braços abertos

quando comparados aos animais normoglicêmicos (FIGURA 2A; $p<0,05$). Entre os animais que foram tratados com o ácido gálico, a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman Keuls mostrou que apenas na dose de 10 mg/kg observou-se uma diferença significativa ($p<0,05$). Já nos animais que foram tratados com a fluoxetina não se observou uma diferença significativa no tempo de permanência nos braços abertos em comparação ao grupo DBT-VEH. No número de entradas nos braços fechados (FIGURA 2B) não houve uma diferença significativa entre todos os grupos.

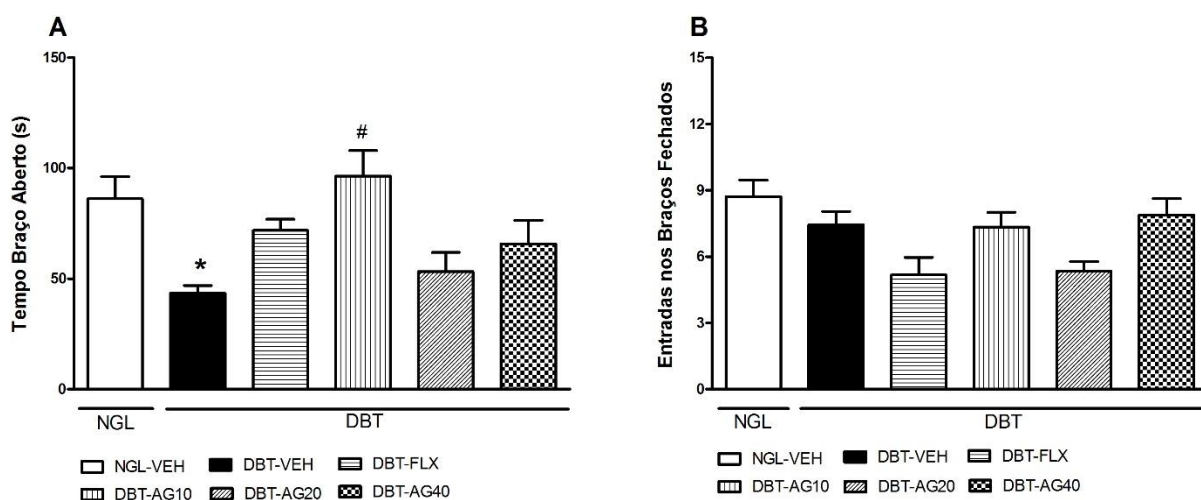


FIGURA 2. Efeito do tratamento prolongado com ácido gálico (AG, 10, 20 ou 40 mg/kg), fluoxetina (FLX, 10 mg/kg) ou veículo (VEH) em animais normoglicêmicos (NGL) ou diabéticos (DBT) sobre o (A) tempo de permanência nos braços abertos e (B) o número de entradas nos braços fechados. Valores estão representados em média \pm EPM; $n=6-8$; * $p<0.05$ comparado ao NGL-VEH; # $p<0.05$ comparado ao DBT-VEH.

As análises estatísticas sobre as medidas etológicas demonstraram que os animais DBT-VEH apresentaram menor tempo de exploração no fim do braço aberto (FIGURA 3A; $p<0,05$) e menor frequência de afundamento da cabeça no braço aberto (FIGURA 3B; $p<0,05$) quando comparados aos animais NGL-VEH. Já nos animais diabéticos que receberam tratamento, apenas o grupo tratado com a dose de 10 mg/kg de ácido gálico obteve um aumento significativo tanto no tempo de exploração no fim do braço aberto ($p<0,05$) quanto na frequência de afundamento da cabeça no braço aberto ($p<0,05$) em relação ao grupo DBT-VEH. Nos grupos que receberam as outras doses do ácido gálico e a fluoxetina não houve diferença significativa nestes parâmetros.

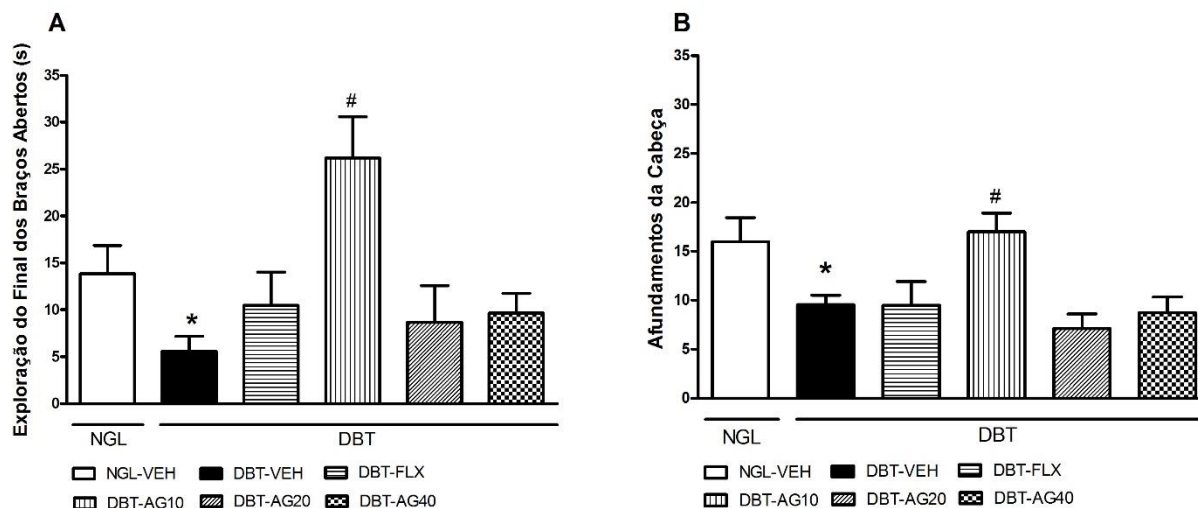


FIGURA 3. Efeito do tratamento prolongado com ácido gálico (AG, 10, 20 ou 40 mg/kg), fluoxetina (FLX, 10 mg/kg) ou veículo (VEH) em animais normoglicêmicos (NGL) ou diabéticos (DBT) sobre o (A) tempo que o animal passa no final dos braços abertos e (B) número de afundamentos da cabeça. Valores estão representados em média \pm EPM; $n = 6 - 8$; * $p < 0.05$ comparado ao NGL-VEH; # $p < 0.05$ comparado ao DBT-VEH.

4.2 TESTE DE TRANSIÇÃO CLARO-ESCURO

A figura 4A mostra que, assim como no teste do LCE, os animais do grupo DBT-VEH apresentaram uma redução significativa do tempo de permanência no compartimento claro quando comparados aos animais NLG-VEH ($p < 0,05$). Neste teste, apenas os animais do grupo DBT-AG10 permaneceram significativamente mais tempo no compartimento claro quando comparados com os animais do grupo DBT-VEH ($p < 0,05$), indicando um efeito do tipo ansiolítico. Com relação ao número de cruzamentos entre os dois compartimentos, demonstrado na figura 4B, não houve diferença significativa entre os grupos analisados.

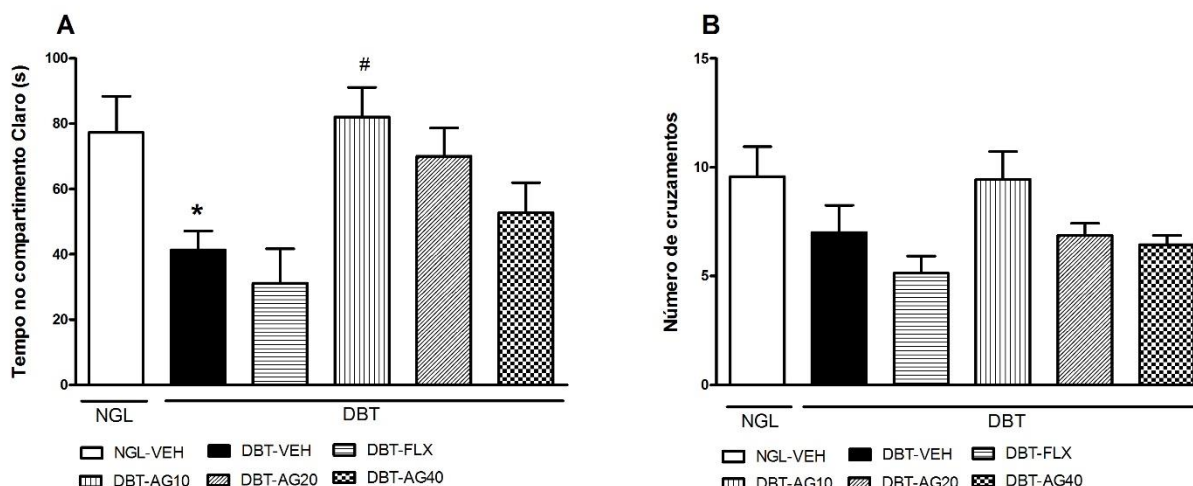


FIGURA 4. Efeito do tratamento prolongado com ácido gálico (AG, 10, 20 ou 40 mg/kg), fluoxetina (FLX, 10 mg/kg) ou veículo (VEH) em animais normoglicêmicos (NGL) ou diabéticos (DBT) sobre o (A) tempo de permanência no compartimento claro e (B) número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro. Valores estão representados em média \pm EPM; n= 6 – 8; *p<0.05 comparado ao NGL-VEH; #p<0.05 comparado ao DBT-VEH.

4.3 TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADO

No TNF, os animais do grupo DBT-VEH apresentaram uma diferença significativa em relação aos animais normoglicêmicos, eles obtiveram maior frequência de imobilidade (FIGURA 5A, $p<0,05$) e menor frequência de escala e natação (FIGURA 5B e 5C, $p<0,05$). No entanto, não houve uma diferença significativa nos animais diabéticos tratados com ácido gálico (em todas as doses), em comparação com os diabéticos tratados com veículo, tanto na frequência de imobilidade como nas frequências de natação e escala. Houve uma diferença significativa apenas no grupo de animais tratados com a fluoxetina, em comparação com o grupo DBT-VEH ($p<0,05$). O tratamento com a fluoxetina levou a uma redução na frequência de imobilidade dos animais (FIGURA 5A) além de um aumento na sua frequência de natação (FIGURA 5B), mas sem alteração significativa na sua frequência de escala (FIGURA 5C).

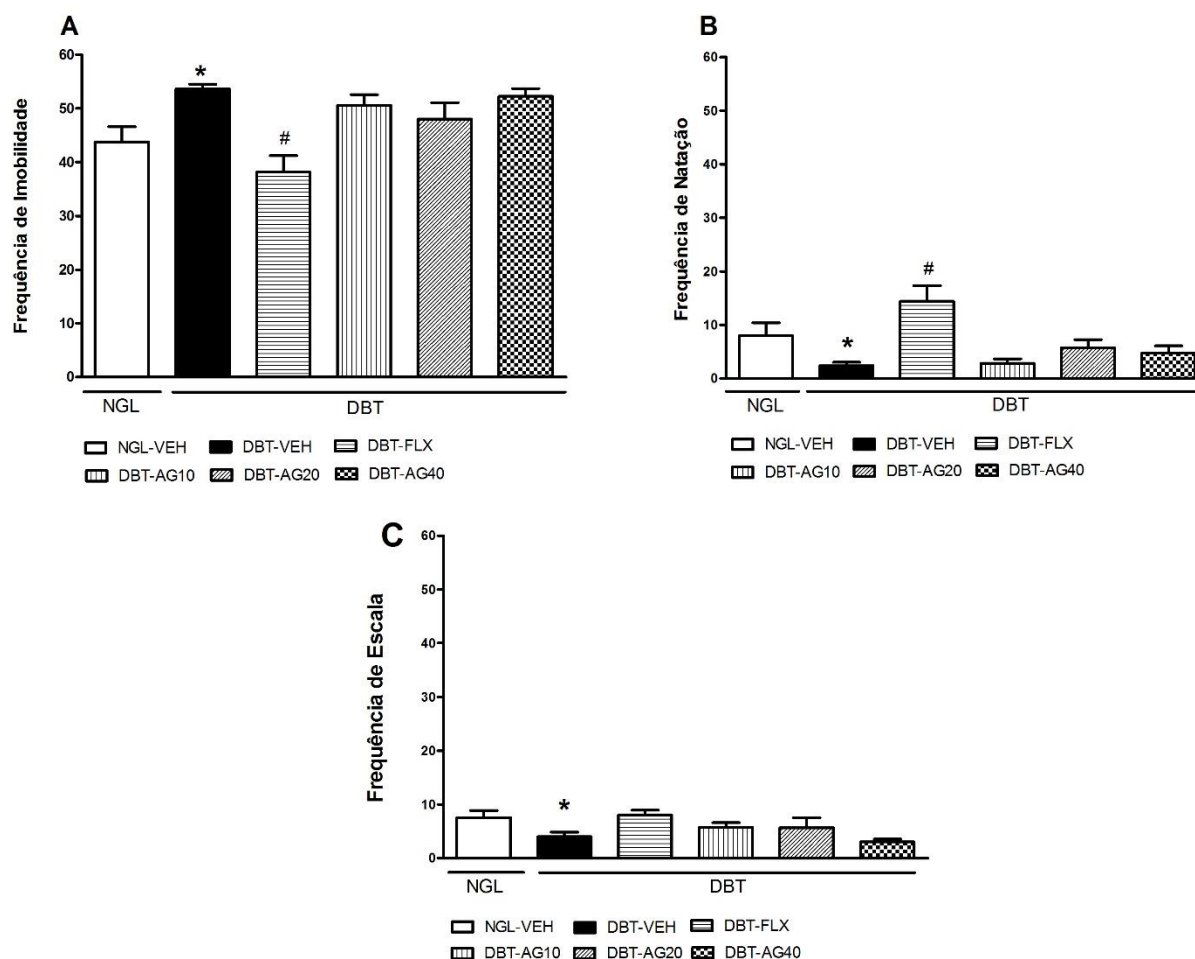


FIGURA 5. Efeito do tratamento prolongado com ácido gálico (AG, 10, 20 ou 40 mg/kg), fluoxetina (FLX, 10 mg/kg) ou veículo (VEH) em animais normoglicêmicos (NGL) ou diabéticos (DBT) sobre a (A) frequência de imobilidade, (B) frequência de natação e (C) frequência de escalada. Valores estão representados em média \pm EPM; $n = 6 - 8$; * $p < 0.05$ comparado ao NGL-VEH; # $p < 0.05$ comparado ao DBT-VEH.

4.4 TESTE DE CAMPO ABERTO

O resultado da frequência de cruzamentos (FIGURA 6A) e de levantamentos (FIGURA 6B) no teste de campo aberto mostrou que, em comparação aos animais NGL-VEH, os animais DBT-VEH tiveram uma redução tanto na frequência de cruzamentos ($p < 0,05$) quanto na frequência de levantamentos ($p < 0,05$), porém não houve uma

diferença significativa entre os grupos de animais diabéticos tratados com veículo, ácido gálico (todas as doses) e fluoxetina.

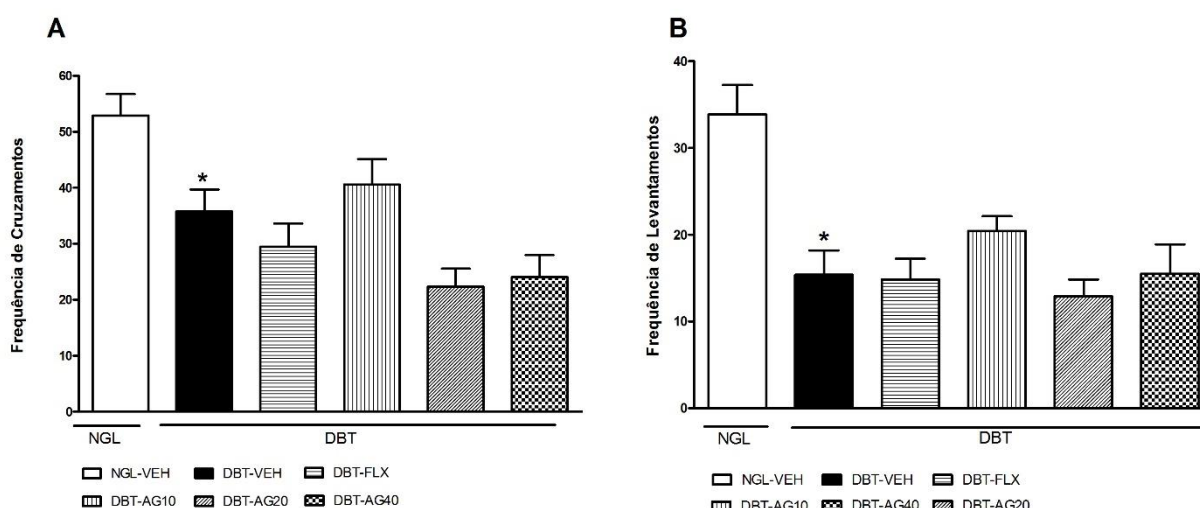


FIGURA 6. Efeito do tratamento prolongado com ácido gálico (AG, 10, 20 ou 40 mg/kg), fluoxetina (FLX, 10 mg/kg) ou veículo (VEH) em animais normoglicêmicos (NGL) ou diabéticos (DBT) sobre a (A) frequência de cruzamentos dos quadrantes do aparato do teste de campo aberto e (B) frequência de levantamentos. Valores estão representados em média \pm EPM; $n = 6 - 8$; * $p < 0.05$ comparado ao NGL-VEH.

4.5 GLICEMIA E GANHO DE PESO

Tanto na glicemia (FIGURA 7A), quanto no ganho de peso (FIGURA 7B), animais DBT-VEH apresentaram um aumento significativo da glicemia ($p < 0,05$) e redução do ganho de peso ($p < 0,05$) quando comparados aos animais normoglicêmicos. Já entre os animais diabéticos tratados, não houve diferença significativa em nenhuma das doses de ácido gálico empregada ou de fluoxetina, em comparação aos diabéticos tratados com veículo.

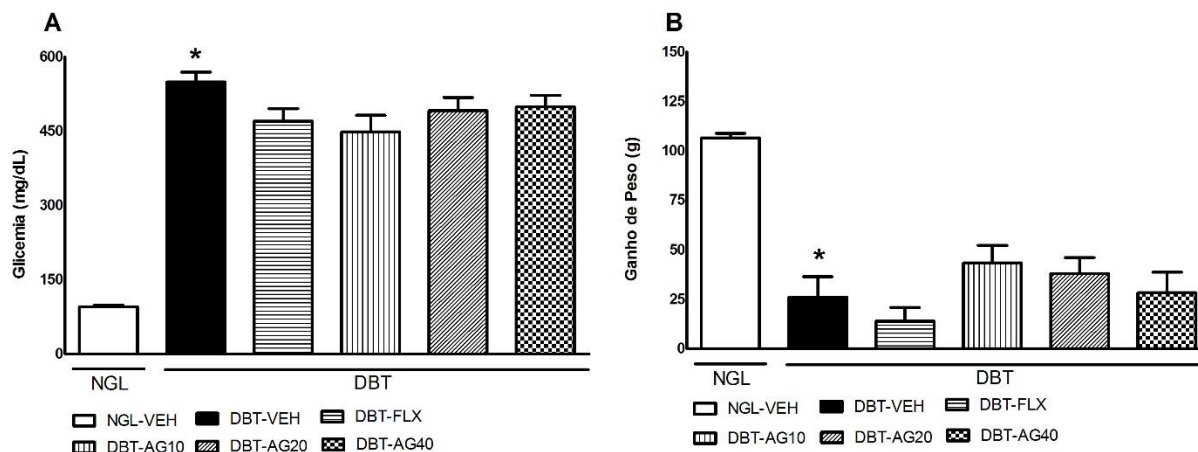


FIGURA 7. Efeito do tratamento prolongado com ácido gálico (AG, 10, 20 ou 40 mg/kg), fluoxetina (FLX, 10 mg/kg) ou veículo (VEH) em animais normoglicêmicos (NGL) ou diabéticos (DBT) sobre a (A) glicemia e (B) ganho de peso. Valores estão representados em média \pm EPM; $n = 6 - 8$; * $p < 0.05$ comparado ao NGL-VEH.

4.6 ESTRESSE OXIDATIVO

As análises de estresse oxidativo (LPO e GSH) foram feitas no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais dos seguintes grupos: NGL-VEH, DBT-VEH, DBT-FLX, DBT-AG10 e DBT-AG40.

4.6.1 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A análise de LPO mostrou que os animais DBT-VEH possuem um aumento significativo no nível de peroxidação lipídica no HIP ($p < 0,05$) e CPF ($p < 0,05$) quando comparados aos animais NLG-VEH. Com relação aos animais tratados com ácido gálico, apenas na dose de 10mg/kg houve uma redução significativa da peroxidação lipídica nestas duas áreas cerebrais (FIGURA 8A e 8B; $p < 0,05$). O tratamento com a fluoxetina não levou a uma redução significativa da LPO no HIP (FIGURA 8A) e nem no CPF (FIGURA 8B).

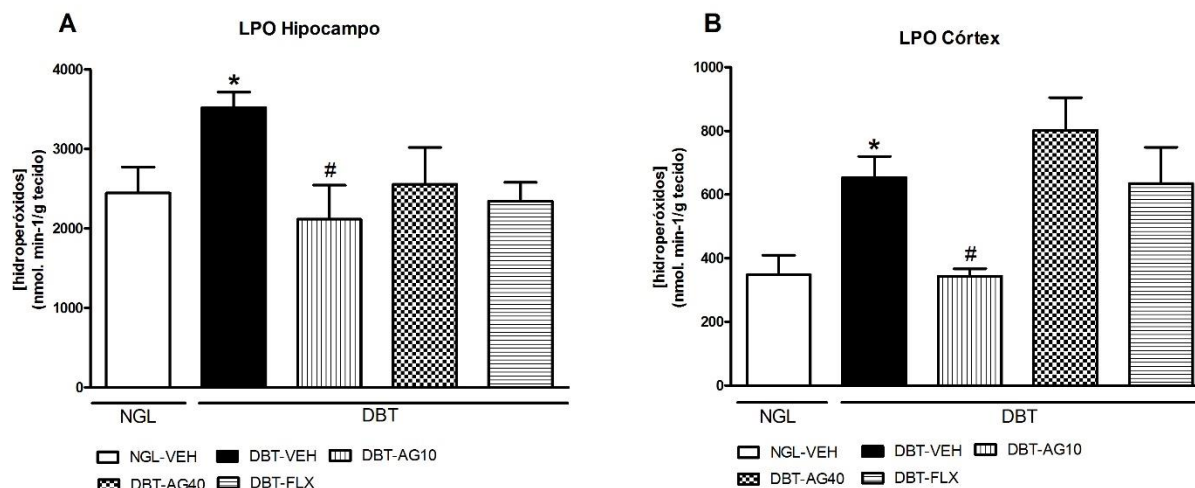


FIGURA 8. Efeito do tratamento prolongado com ácido gálico (AG, 10 ou 40 mg/kg), fluoxetina (FLX, 10 mg/kg) ou veículo (VEH) em animais normoglicêmicos (NGL) ou diabéticos (DBT) sobre os níveis de peroxidação lipídica (LPO, [hidroperóxidos] por nmol. min-1/ mg de tecido) no (A) hipocampo e (B) córtex pré-frontal. Valores estão representados em média \pm EPM; $n = 6 - 8$; * $p < 0.05$ comparado ao NGL-VEH; # $p < 0.05$ comparado ao DBT-VEH.

4.6.2 GLUTATIONA REDUZIDA

Os resultados mostram que os animais do grupo DBT-VEH exibem uma redução no nível de GSH tanto no HIP (FIGURA 9A; $p < 0,05$) quanto no CPF (FIGURA 9B; $p < 0,05$) quando comparados aos animais NGL-VEH. No entanto, só o tratamento com o ácido gálico na dose de 10mg/kg preveniu a redução do nível de GSH nestas duas áreas do cérebro (FIGURA 9A e 9B; $p < 0,05$). Já no tratamento com a fluoxetina (10 mg/kg) não houve a redução desse nível de modo significativo no HIP e CPF (FIGURA 9A e 9B, respectivamente).

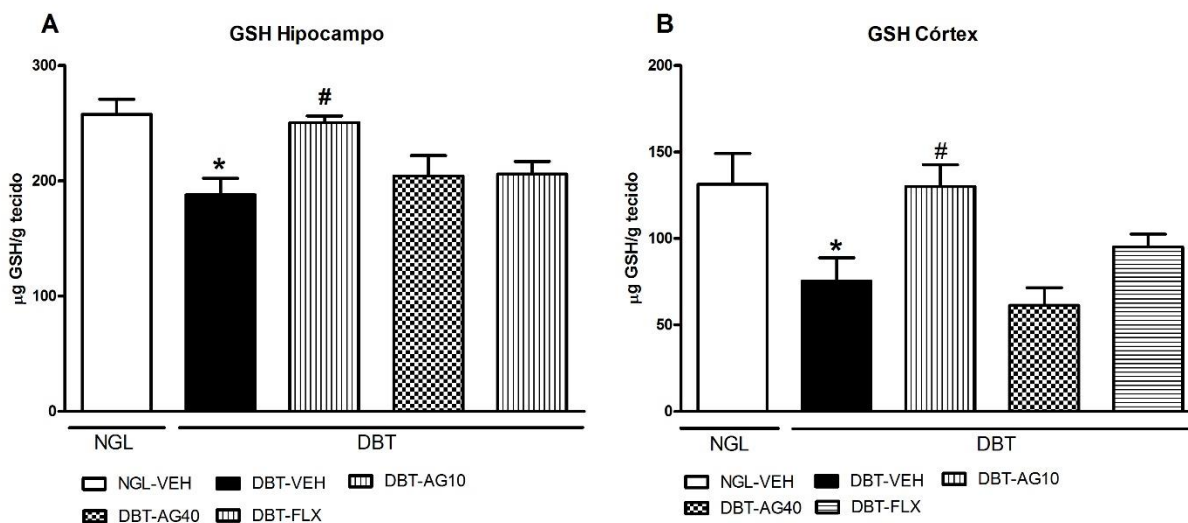


FIGURA 9. Efeito do tratamento prologado com ácido gálico (AG, 10 OU 40 mg/kg), fluoxetina (FLX, 10 mg/kg) ou veículo (VEH) em animais normoglicêmicos (NGL) ou diabéticos (DBT) sobre o nível de GSH ($\mu\text{g/g}$ de tecido) no (A) hipocampo e (B) córtex pré-frontal. Valores estão representados em média \pm EPM; $n = 6 - 8$; * $p < 0.05$ comparado ao NGL-VEH.

4.6.3 TESTE DE DPPH

A ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls revelou que no teste de DPPH apenas o ácido gálico possui uma atividade de eliminação de radicais livres mesmo nas suas concentrações mais baixas (FIGURA 10A; $p < 0,05$). Já a fluoxetina (FIGURA 10B), não possui uma atividade de eliminação de radicais livres apresentando nas suas diferentes concentrações níveis de absorbância com valores muito próximos e até maiores do que o do controle negativo utilizado no teste.

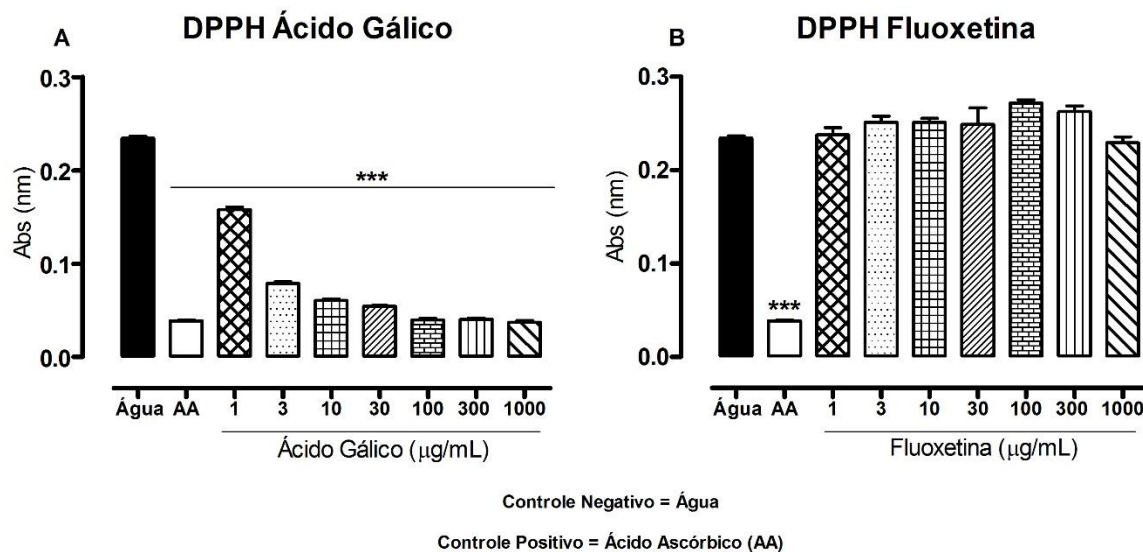


FIGURA 10. Efeitos do (A) ácido gálico, (B) fluoxetina, água destilada (controle negativo) e ácido ascórbico (controle positivo) sobre a atividade de eliminação de radicais livres no teste de DPPH. O teste foi realizado em triplicata. Valores estão representados em média \pm EPM; *** $p < 0.05$ comparado ao grupo água.

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho confirmaram dados do laboratório mostrando que os animais diabéticos exibem um comportamento do tipo ansiogênico mais pronunciado nos dois testes de ansiedade empregados neste estudo - LCE e TCE. Na mesma direção deste efeito do tipo ansiogênico, demonstrou-se pela primeira vez que esses mesmos animais apresentaram no LCE, quando comportamentos etológicos de ansiedade foram avaliados, um menor tempo gasto na exploração do fim do braço aberto e um menor número de afundamentos da cabeça no braço aberto, indicativo de um efeito ansiogênico. Também se observou que o tratamento com o ácido gálico, na dose de 10 mg/kg, foi capaz de produzir um efeito ansiolítico nos animais diabéticos tratados que foram analisados nestes testes de ansiedade. Eles apresentaram um aumento significativo no tempo de permanência nos braços abertos (LCE) e compartimento claro (TCE) além de ter um aumento no tempo gasto na exploração do fim do braço aberto e um maior número de afundamentos da cabeça (LCE). Porém, no

tratamento com ácido gálico em todas as doses administradas (10, 20 e 40 mg/kg) não se obteve um efeito antidepressivo no TNF, os animais tratados apresentaram aumento da frequência de imobilidade e diminuição da frequência de escalada e natação semelhante ao que foi observado nos animais DBT-VEH. No entanto, este composto foi capaz de produzir um efeito neuroprotetor e antioxidante (corroborado pelo teste de DPPH) tanto no HIP quanto no CPF dos animais diabéticos, reduzindo os níveis de LPO e aumentando os níveis de GSH nessas áreas cerebrais, diferentemente do que foi observado nos animais DBT-VEH.

5.1 ANSIEDADE

O labirinto em cruz elevado é um dos testes sobre a ansiedade mais utilizados na pesquisa pré-clínica (SORREGOTTI et al., 2013). Este teste é derivado da observação inicial de que, em um labirinto que consiste de braços abertos e fechados, ratos mostram mais tempo de exploração nos braços fechados e normalmente evitam aqueles braços sem paredes (braços abertos) (PELLOW et al., 1985). Assim, a motivação para ficar em um espaço protegido, é naturalmente associada com segurança e se opõe a motivação para explorar um espaço desprotegido, que é naturalmente associada a possível ameaça e perigo, o que faz o animal passar por um *“avoidance/approach conflict”* (ENNACEUR & CHAZOT, 2016). Usando um tipo de labirinto similar (labirinto em X), os autores Handley e Mithani (1984) confirmaram que não só os ratos evitam os braços abertos, como também demonstraram que esse ato de evitar estes braços é reduzido quando os animais foram tratados com diazepam (um ansiolítico) e aumentado com picrotoxina (um agente ansiogênico). Pellow e colaboradores (1985) obtiveram um resultado semelhante no LCE utilizando diazepam e ioimbina (ansiogênico). Deste modo, os índices primários de ansiedade neste teste são considerados de natureza espaço-temporal (tempo gasto nos braços abertos e número de entradas nos braços fechados), porém análises etológicas (tempo de exploração do fim do braço aberto e número de afundamentos da cabeça) também podem ser analisadas neste contexto indicando o comportamento exploratório do animal (RODGERS et al., 1997).

O outro teste de ansiedade usado no presente estudo, o teste de transição claro-escuro, foi desenvolvido antes do LCE por Crawley e Goodwin (1980). Ele é baseado na aversão natural dos roedores para locais com luz brilhante (compartimento claro) e gera um conflito inerente entre o comportamento exploratório do animal e sua aversão ao compartimento iluminado. O tratamento com ansiolíticos tais como benzodiazepínicos, aumenta o tempo que o animal gasta no compartimento claro, assim como o número de transições entre os dois compartimentos (claro e escuro) (CAMPOS et al., 2013).

Em relação aos dados mostrando o comportamento do tipo ansiogênico mais pronunciado nos animais diabéticos, importante ressaltar que estes corroboram com outros estudos demonstrando também um comportamento do tipo ansiogênico mais pronunciado nesses animais (CAN et al. 2011; AKSU et al. 2012; ATES et al. 2014; GUPTA et al. 2014, GAMBETA et al., 2015). Isto pode ser devido ao impacto que o diabetes provoca no sistema nervoso central (ROWLAND & BELLUSH, 1989; MAGARIÑOS & MCEWEN, 2000; REVSIN & KLOET, 2009). A hiperglicemia persistente está associada a desregulação dos sistemas de neurotransmissores, inflamação do cérebro, superatividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal associado a um aumento dos níveis de glicocorticoides circulantes e aumento no estresse oxidativo (PITOCCO et al. 2010; ZANOVELI et al. 2016). Assim, a fim de melhor compreender o envolvimento do estado hiperglicêmico produzido pelo diabetes, no aumento do estresse oxidativo que leva a um comportamento de ansiedade, o efeito do tratamento prolongado com ácido gálico, um antioxidante, foi investigado nestes testes.

Os resultados mostraram que o tratamento prolongado com ácido gálico induziu um efeito do tipo ansiolítico apenas em animais diabéticos tratados com a dose de 10 mg/kg. Geralmente, animais tratados com compostos ansiolíticos como benzodiazepínicos (diazepam, por exemplo) passam significativamente mais tempo explorando os braços abertos quando comparados com os animais controles tratados com veículo (PELLOW et al., 1985). Deste modo, os animais tratados na menor dose do ácido gálico obtiveram um maior tempo gasto nos braços abertos (FIGURA 2A) e no compartimento claro (FIGURA 4A), além de apresentarem um aumento em seu comportamento exploratório por terem um maior tempo gasto na exploração do fim do braço aberto (FIGURA 3A) e aumento no número de afundamentos da cabeça (FIGURA

3B) no teste do LCE. No entanto, com o ácido gálico administrado nas doses de 20 e 40 mg/kg não se obteve um efeito significativo em comparação com o animal diabético controle tanto nos resultados de avaliação das medidas tradicionais de ansiedade avaliadas nos testes (FIGURAS 2A, 2B, 4A e 4B), como nos resultados das análises de parâmetros etológicos avaliadas no teste do LCE (FIGURAS 3A e 3B).

Com relação a fluoxetina, que foi utilizada como controle positivo nos dois testes de ansiedade, não houve uma resposta significativa em nenhum parâmetro de ansiedade (FIGURAS 2A, 2B, 4A e 4B) ou etológico (FIGURAS 3A e 3B) avaliado. Os antidepressivos, particularmente aqueles pertencentes à classe dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), como a fluoxetina, são também aprovados e recomendados para o tratamento de muitos dos tipos de transtornos de ansiedade em pacientes que possuem ou não depressão (SCHOEVERS et al., 2008). O papel da serotonina (5-HT) na ansiedade é complexo, mas por serem usados os ISRSs para o seu tratamento, isto implica que os modelos animais de ansiedade deveriam ser sensíveis aos ISRSs e a outros antidepressivos, para que eles tivessem uma boa validade preditiva. No entanto, de acordo com uma revisão de Borsini e colaboradores (2002), os resultados com ISRSs, em diferentes espécies de roedores e doses utilizadas (tratamento crônico e/ou agudo) no teste de LCE são inconsistentes. Tanto um efeito ansiogênico como nenhum efeito já foram descritos. O mesmo acontece no teste de TCE, não há resultados claros com a administração de vários tipos de ISRSs, pois eles podem induzir efeito ansiogênico, ansiolítico ou nenhum efeito (SANCHEZ & MEIER, 1997; KSHAMA et al. 1990; SILVA et al., 1999; SILVA & BRANDÃO, 2000; ROBERT et al., 2011).

Segundo Bourin (2015), os efeitos paradoxais da manipulação de 5-HT em modelos animais têm sido atribuídos tanto ao reconhecimento de que esses modelos refletem diferentes mecanismos neurobiológicos, como a múltiplos receptores de 5-HT localizados tanto pré ou pós-sinapticamente que possuem diferentes funções em vários aspectos da ansiedade. A existência de vários receptores de 5-HT e a falta de ligantes com seletividade suficiente para esses receptores tornam difícil determinar inequivocadamente se um único subtipo de receptor da 5-HT modula uma resposta biológica particular, ou está criticamente envolvido em uma função específica do cérebro.

Por isso, o papel específico da 5-HT em vários aspectos da ansiedade e em diferentes tipos de modelos animais ainda é em grande parte desconhecido. O autor enfatiza que por este motivo os compostos moduladores da serotonina são particularmente propensos a resultados discrepantes no LCE, o que pode ser explicado pelo teste detectar múltiplos efeitos de drogas que interagem com o sistema da 5-HT. Assim, de acordo com Borsini (2002), o teste do LCE não tem validade preditiva como um modelo animal para medir os efeitos ansiolíticos de vários compostos antidepressivos usados no tratamento da ansiedade e de acordo com Griebel e colegas (1997), a sensibilidade deste teste é limitada a compostos benzodiazepínicos que são relacionados com ação em receptores GABA-A (compostos GABAérgicos). Com relação ao teste TCE, Borsini (2002) conclui que a validade preditiva desse modelo animal é semelhante ao do LCE, sendo ele também sensível somente a ação ansiolítica de benzodiazepínicos.

Ademais, não houve diferença significativa tanto no número de entradas nos braços fechados no teste de LCE (FIGURA 2B) e número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro no teste de TCE (FIGURA 4B), esses dois parâmetros também são utilizados para avaliar a atividade locomotora dos animais. Desta maneira, de acordo com estes resultados, não há diferença estatística na atividade locomotora dos animais diabéticos quando comparados aos normoglicêmicos.

Ainda é incerto o mecanismo de ação do ácido gálico. Os benzodiazepínicos potencializam os efeitos do ácido gama-aminobutírico (GABA) e eles fazem isso através de uma ação nos receptores benzodiazepínicos sendo então capazes de produzir um efeito calmante, diminuindo a ansiedade, relaxando os músculos e aliviando os sintomas de excitação relacionados com o medo do corpo (por exemplo, coração acelerado e tremores) (STARCEVIC, 2012). Neste sentido, há estudos que tentam descobrir um possível mecanismo de ação para a ação ansiolítica do ácido gálico. Singh e colaboradores (2013) propõem que como ele apresenta efeitos ansiolíticos no teste de LCE e TCE e estes são semelhantes aos efeitos do diazepam (maior tempo gasto nos braços abertos e compartimento claro), um possível mecanismo de ação dessa droga pode ser postulado através de suas propriedades GABAérgicas. No entanto, Mansouri e colegas (2014) sugerem que os efeitos ansiolíticos do ácido gálico são principalmente mediados via sistema serotoninérgico. Eles observaram que os efeitos ansiolíticos deste

composto foram antagonizados pelo WAY-100635, um antagonista seletivo do receptor de serotonina 5-HT_{1A}, e antagonizados apenas parcialmente pelo flumazenil, um receptor antagonista GABA-benzodiazepínico. Deste modo, mais estudos ainda são necessários para elucidar os mecanismos detalhados da ação do efeito ansiolítico do ácido gálico.

5.2 DEPRESSÃO

O teste de natação forçada é muito utilizado para avaliar potenciais drogas antidepressivas. Ele foi descrito por Porsolt (1979), e é baseado na observação de que ratos quando forçados a nadar em um espaço restrito, acabam parando de lutar entregando-se às condições experimentais. Esta condição de “desespero comportamental” é considerada um comportamento do tipo depressivo sendo utilizado para avaliar várias drogas antidepressivas. Assim, quando tratados com antidepressivos entre as sessões de pré-teste e teste, os animais persistem ativamente em comportamentos de escape por períodos mais longos de tempo do que os animais tratados com veículo. O teste de natação forçada modificado descrito por Cryan e colaboradores (2002) foi utilizado neste trabalho, ele baseia-se no teste de Porsolt (1979), porém a sensibilidade do teste é aumentada de modo que uma analogia entre respostas comportamentais ativas (natação e escalada) e passiva (imobilidade) podem ser feitas também com neurotransmissores.

Neste sentido, foram analisados os comportamentos de escalada, definida como os movimentos de subida e descida nas patas da frente ao longo do cilindro com água, os comportamentos de natação, ou seja, movimento geralmente horizontal em todo o cilindro, que também inclui a passagem para outro quadrante e os de imobilidade, que é definida, como no teste de Porsolt tradicional, quando nenhuma atividade adicional é observada diferente do que o necessário para manter a cabeça do rato acima da água. Esses movimentos foram observados a cada 5 segundos e sua frequência anotada para avaliação. Deste modo, o grande avanço do TNF modificado é que ele permite a analogia entre neurotransmissores e comportamento; ou seja, agentes que aumentam a

disponibilidade de dopamina/noradrenalina diminuem a imobilidade com um correspondente aumento no comportamento de escalada, enquanto que os compostos serotoninérgicos, tais como os ISRSs, diminuem também a imobilidade, mas aumentam o comportamento de natação.

Como esperado, este trabalho demonstrou que animais normoglicêmicos possuem esse “desespero comportamental” ou comportamento do tipo depressivo quando aumentam a sua frequência de imobilidade. De acordo com outros estudos (GOMEZ & BARROS, 2000; WAYHS et al., 2010; CALETTI et al., 2012; DE MORAIS et al., 2014), os resultados obtidos neste teste mostram que animais diabéticos exibem um comportamento do tipo depressivo ainda mais pronunciado quando comparado com os animais normoglicêmicos. Eles tiveram uma maior frequência de imobilidade (FIGURA 5A), além de uma menor frequência de natação (FIGURA 5B) e escalada (FIGURA 5C), evidenciando ainda mais seu comportamento do tipo depressivo.

O grupo de animais tratados com fluoxetina, controle positivo, apresentaram o resultado esperado de acordo com Cryan e colaboradores (2002) para antidepressivos do tipo ISRSs. O tratamento com a fluoxetina, diminuiu a frequência de imobilidade (FIGURA 5A), aumentando a frequência de natação (FIGURA 5B) destes animais quando comparados aos animais DBT-VEH. Apenas na frequência de escala (FIGURA 5C) não se obteve uma mudança significativa. Assim, o tratamento com a fluoxetina proporcionou um efeito antidepressivo nestes animais diabéticos.

Com relação ao efeito antidepressivo do ácido gálico, Chhillar e Dhingra (2012) observaram-no em camundongos, submetidos ao modelo de depressão de estresse leve imprevisível (*unpredictable mild stress*). No entanto, o tratamento com ácido gálico feito no presente estudo não foi capaz de alterar os parâmetros analisados. Aqui, importante ressaltar que esses animais eram animais diabéticos. Ou seja, assim como os DBT-VEH, os animais diabéticos tratados com a droga obtiveram maior frequência de imobilidade (FIGURA 5A) e menor frequência de natação (FIGURA 5B) e escalada (FIGURA 5C), indicando comportamento do tipo depressivo desses animais.

5.3 ATIVIDADE LOCOMOTORA

O número de cruzamentos e a frequência de levantamentos são utilizadas como medidas de locomoção e também de comportamento exploratório do animal (ESPEJO, 1997). Assim, quando avaliados no teste de campo aberto, os animais diabéticos exibiram uma diminuição de mobilidade e do comportamento exploratório quando comparados aos animais normoglicêmicos (FIGURAS 6A e 6B). Os animais DBT-VEH apresentaram uma diminuição significativa tanto na frequência de cruzamentos quanto na de levantamentos e entre os grupos de ratos diabéticos tratados com fluoxetina e diferentes doses do ácido gálico, não houve uma mudança significativa da mobilidade comparando-se com os animais DBT-VEH.

Os resultados obtidos com animais diabéticos no TCA são contraditórios. Há estudos mostrando que não há uma alteração significativa da mobilidade do animal diabético quando comparado ao animal normoglicêmico (DE MORAIS et al., 2014; GAMBETA et al., 2015). E, no entanto, há outros que observaram uma redução da mobilidade em animais diabéticos (HAIDER et al., 2012; REDIVO et al., 2015). Esta diferença pode ser devida tanto ao tempo da condição diabética induzida no animal como ao diferente tipo de tratamento recebido por ele. Neste trabalho, o ácido gálico não alterou significativamente a atividade locomotora dos animais diabéticos tratados com relação ao DBT-VEH sugerindo-se que seu efeito não está associado a nenhum efeito locomotor.

5.4 GANHO DE PESO E GLICEMIA

Como um modelo de diabetes tipo 1, já está bem estabelecido que a administração de STZ tem como resultado a toxicidade das células β pancreáticas, o que leva ao surgimento dos sinais clínicos do diabetes (RADENKOVIĆ et al., 2016). Assim, a ação da STZ é acompanhada pelo aumento dos níveis de glicose sanguínea e redução do ganho de peso, o que foi observado nos resultados obtidos dos animais DBT controle comparados aos animais NGL neste trabalho. O tratamento prolongado com ácido gálico, em todas as doses utilizadas, não foi capaz de induzir mudanças significativas na

redução da glicemia (FIGURA 7A) e no ganho de peso (FIGURA 7B) como já foi observado por outros estudos utilizando o mesmo composto (LATHA & DAISY, 2011; PUNITHAVATHI et al., 2011 e STANELY et al., 2011). Uma das hipóteses para esta diferença pode ser devido a diferente concentração de STZ utilizada na indução do diabetes, neste trabalho foi utilizada uma dose de 60 mg/kg, enquanto que nos outros foram utilizadas doses de 40 mg/kg a 50 mg/kg. Observou-se que a glicemia dos animais que receberam essa dose maior de STZ chegou a ser superior a 600 mg/dL, um valor muito mais elevado do que o observado nos estudos desses outros autores onde o valor máximo de glicemia observado foi de mais ou menos 370 mg/dL. No tratamento com a fluoxetina também não se obteve mudanças significativas nestes parâmetros (FIGURAS 7A e 7B).

5.5 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio nas reações celulares de redução e oxidação resultando em um aumento de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (ERONs) e/ou diminuição na defesa de antioxidantes (GASPAROVIC et al., 2010). Assim, existem evidências de que a hiperglicemia causa a produção de ERONs, levando a um aumento do estresse oxidativo em vários tecidos (EVANS et al., 2002; FARDOUN, 2007; DE MORAIS et al., 2014). A hiperglicemia persistente (não tratada ou descompensada) promove o estresse oxidativo, que é a base das principais complicações do diabetes, tais como aterosclerose, nefropatia, retinopatia e neuropatia, devido à incapacidade destes tecidos lidarem com níveis mais elevados de glicose no interior das células (GIACCO & BROWNLEE, 2010), isto afeta todas as macromoléculas celulares, incluindo o DNA causando mutações, proteínas, levando a sua inativação e lipídeos causando a peroxidação lipídica (GASPAROVIC et al., 2010). Neste sentido, o sistema nervoso central é muito vulnerável ao aumento do estresse oxidativo. O cérebro necessita de uma grande quantidade de oxigênio, o que consequentemente promove a formação de radicais livres de oxigênio e EROs. Além disso, ele possui modestas

defesas antioxidantes e uma constituição rica em lipídios. (BOUAYED et al., 2009; KANAZAWA et al., 2016).

A LPO é uma parte crucial do estresse oxidativo. Ela compreende várias reações em cadeia permitindo a propagação dos danos causados pelas ERONs, para macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos e lipídios) (GASPAROVIC et al., 2010). Deste modo, os elevados níveis de LPO são atribuídos ao aumento de ERONs, ademais ela afeta a integridade celular somente quando os mecanismos antioxidantes não são mais capazes de lidar com a geração de radicais livres (ANWER et al., 2012). Neste contexto, os resultados deste trabalho demonstraram que os animais diabéticos possuem um aumento de LPO no HIP e no CPF (FIGURA 8A e 8B, respectivamente), e o tratamento com o ácido gálico, apenas na dose de 10 mg/kg, foi capaz de reduzir a LPO nestas áreas cerebrais, o que ajuda a corroborar a ação de um mecanismo antioxidante deste composto. De maneira surpreendente, o tratamento com o antidepressivo fluoxetina não foi capaz de reduzir os níveis de LPO tanto no HIP como no CPF (FIGURA 8A e 8B, respectivamente).

O GSH é conhecido por proteger o sistema celular contra os efeitos tóxicos da LPO. Neste sentido, já foi proposto que os antioxidantes que mantêm a concentração de GSH podem vir a restaurar os mecanismos de defesa celular, bloqueando a LPO e ajudando a proteger o tecido contra danos oxidativos (ANWER et al., 2012). O GSH é o principal antioxidante presente no cérebro (KANAZAWA et al., 2016). Assim, como esperado, os resultados obtidos mostraram que os animais DBT-VEH apresentam no HIP (FIGURA 9A) e CPF (FIGURA 9B), uma diminuição no nível de GSH quando comparados aos animais NGL-VEH. Este declínio no nível de GSH pode ser devido a geração excessiva de radicais livres, pela exposição à STZ ou pelo alto nível de glicose (SHARMA et al., 2016). Logo, foi observado que o tratamento com o ácido gálico apenas na menor dose administrada (10 mg/kg) foi capaz de aumentar significativamente esse nível nas duas estruturas cerebrais analisadas (FIGURA 9A e 9B). Porém, no tratamento com a fluoxetina não foi observado um aumento significativo do nível de GSH no HIP e nem no CPF (FIGURAS 9A e 9B).

Os resultados obtidos demonstram que o ácido gálico possui uma propriedade antioxidante que ajudou na redução da LPO e no aumento do GSH no CPF e HIP dos animais diabéticos. Esta propriedade também foi comprovada no teste de DPPH onde o ácido gálico demonstrou atividade antioxidante com níveis significativamente mais baixos de absorbância do que o controle negativo (água) mesmo em suas menores concentrações (FIGURA 10A). Este teste é praticado rotineiramente para a avaliação da eliminação de radicais livres de uma molécula com potencial antioxidante, sendo considerado também um dos métodos padrão para a avaliação de propriedades antioxidantes de compostos puros. Ele se baseia no princípio de que o DPPH, depois de aceitar um átomo de hidrogênio de uma molécula (por exemplo, um antioxidante), é reduzido, e a cor púrpura da solução muda para amarelo, concomitante com uma redução na sua absorbância (MISHRA et al., 2012). Ademais, em conjunto com esta ação antioxidante, também se encontra a ação neuroprotetora do ácido gálico observada no HIP e CPF pela diminuição do estresse oxidativo nestas áreas cerebrais.

Com relação a fluoxetina, os resultados demonstram que o seu tratamento não foi capaz de produzir um efeito antioxidante nos animais diabéticos, pois não houve redução dos níveis de LPO e nem aumento dos níveis de GSH nas estruturas cerebrais analisadas dos animais que receberam seu tratamento. Isto foi corroborado com o resultado do teste de DPPH. Neste teste, a fluoxetina apresentou níveis de absorbância mais próximos do controle negativo utilizado (água) (FIGURA 10B). No entanto, o seu tratamento foi capaz de induzir um efeito antidepressivo nos animais diabéticos e já foi sugerido que este composto possui alguma atividade antioxidante e de neuroproteção (BILICI et al. 2001; KHANZODE et al. 2003; HERKEN et al. 2007; MORETTI et al., 2012). Huether e Schuff-Werner (1996) propuseram que este efeito protetor pode ser devido ao fato de que esta droga aumenta os níveis de serotonina. Outros autores relatam que a fluoxetina sozinha promove a mudança no estado antioxidante de animais não-estressados, o que significa que esse antidepressivo pode não alterar a defesa antioxidante na ausência de estresse oxidativo (DJORDJEVIC et al., 2011; NOVÍO et al., 2011). De acordo com Caiaffo e colaboradores (2016), isto sugere que a fluoxetina pode ter um efeito antioxidante somente sobre condições de dano oxidativo e os benefícios clínicos da sua administração estão relacionados com as funções de modulação celular

no sistema nervoso central e periférico, o que pode indicar que a fluoxetina tem seu efeito antidepressivo agindo em diferentes mecanismos do que o ácido gálico, e eles não estão relacionados a diminuição do estresse oxidativo especificamente no SNC.

A diminuição das defesas antioxidantes e da capacidade antioxidante é comum no diabetes, uma vez que a fisiopatologia da doença é baseada no aumento do estresse oxidativo devido à hiperglicemia. Sob condições diabéticas, a hiperglicemia pode induzir grandes quantidades de ERONs, que são responsáveis pela disfunção progressiva das células β pancreáticas, piorando a resistência à insulina e promovendo uma maior deficiência relativa de insulina. As células β , em particular, são muito sensíveis às ERONs porque elas não possuem muita proteção antioxidante. Deste modo, o desequilíbrio na formação de ERONs pode também indiretamente danificar essas células, ativando uma variedade de vias de sinalização intracelular sensíveis ao estresse levando a mais distúrbios nos sistemas de defesa antioxidantes em diabéticos (ANWER et al., 2012; PARK et al., 2016).

Como consequência disto, na presença de um estresse oxidativo, a constituição rica em lipídios do cérebro favorece a peroxidação lipídica que irá resultar na diminuição da fluidez da membrana e danos em proteínas de membrana causando a inativação de receptores, enzimas e canais de íons. Ademais, ele também pode causar alterações na neurotransmissão, na função neuronal e na atividade total do cérebro (BOUAYED et al., 2009). Como áreas cerebrais importantes como o HIP e CPF são afetados por este desequilíbrio, e apesar de não se saber com certeza absoluta como isso acontece, o estresse oxidativo tem sido associado a várias doenças que comprometem o sistema nervoso, como a ansiedade e a depressão. Assim sendo, trabalhos demonstraram que a diminuição do estresse oxidativo causa um efeito ansiolítico e antidepressivo em animais diabéticos (DESRUMAUX et al., 2005; BOUAYED et al. 2009; MICHEL et al., 2012; DE MORAIS et al., 2014). No entanto, neste trabalho a atividade antioxidante do ácido gálico não foi capaz de produzir um efeito antidepressivo nos animais diabéticos tratados, bem como a ausência do efeito antioxidante da fluoxetina não interferiu no seu efeito, que foi um efeito do tipo antidepressivo. Isto sugere que o aumento do estresse oxidativo não é o único mecanismo envolvido na depressão relacionada ao diabetes e

que o surgimento da ansiedade em conjunto com esta doença parece ser mais sensível a esse desequilíbrio no sistema antioxidante natural. Neste sentido, como a hiperglicemia ainda é responsável por um aumento no estresse oxidativo, os antioxidantes podem ser um caminho alternativo para o tratamento dessas comorbidades psiquiátricas ajudando também em sua prevenção ou redução quando elas estão associadas ao diabetes. Por este motivo, compostos como o ácido gálico podem ajudar na proteção das células contra estes efeitos citotóxicos. Assim, a diminuição da peroxidação lipídica e melhoramento na ação de antioxidantes (como o GSH) pode ser um contribuinte para a prevenção das complicações do diabetes e das doenças associadas a ele.

6 CONCLUSÃO

O tratamento com o ácido gálico foi capaz de induzir um efeito ansiolítico nos animais diabéticos. Isto pode ser devido a ação neuroprotetora e antioxidante deste composto que ajudou a melhorar os parâmetros de estresse oxidativo no hipocampo e córtex pré-frontal desses animais. Porém, uma vez que todas as doses do ácido gálico utilizadas no presente estudo não foram capazes de induzir uma reversão do estado depressivo e nem uma reversão completa do comportamento do tipo ansiogênico dos animais tratados, sugere-se que o estresse oxidativo não é o único fator envolvido na fisiopatologia dessas psicopatologias associadas ao diabetes. Pois, foi observado que o tratamento com a fluoxetina induziu um efeito antidepressivo nos animais diabéticos sem que esse composto tivesse algum efeito antioxidante que levasse a uma alteração ou melhora nos parâmetros de estresse oxidativo analisados nestes animais. Assim, ainda são necessários mais estudos para se obter uma melhor compreensão e maior conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos que relacionam a depressão e ansiedade ao diabetes.

REFERÊNCIAS

AKSU, I.; ATES, M.; BAYKARA, B. et al. Anxiety correlates to decreased blood and prefrontal cortex IGF-1 levels in streptozotocin induced diabetes. **Neurosci Lett.**, v. 531, p. 176 – 181, 2012.

ANDERSON, R. J.; FREEDLAND, K. E.; CLOUSE, R. E.; LUSTMAN, P. J. The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes: a meta-analysis. **Diabetes Care**, v. 24, p. 1069 – 1078, 2001.

ANWER, T.; SHARMA, M.; PILLAI, K. K.; KHAN, G. Protective effect of *Withania somnifera* against oxidative stress and pancreatic β -cell damage in type 2 diabetic rats. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 69, n. 6, p. 1095 – 1101, 2012.

ASSOCIATION, American Psychiatric. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5), fifth edition – depression**. 2013. Disponível em <<http://www.psychiatry.org/patients-families/depression/what-is-depression>>. Acesso em 30 de set. 2016.

ATES, M.; DAYI, A.; KIRAY, M. et al. Anxiety and depression-like behavior are correlated with leptin and leptin receptor expression in prefrontal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. **Biotech Histochem.**, v. 89, p. 161 – 171, 2014.

BABURAO, J. A.; ANAND, J. V. Vitamin E, its beneficial role in diabetes *mellitus* (dm) and its complications. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 6, n. 10, p. 1624 – 1628, 2012.

BAMBOLKAR, S.; SAINANI, G. S. Evaluation of oxidative stress in diabetic with or without vascular complications. **Journal of the Association of Physicians of India**, v. 43, p. 10 – 12, 1995.

BEHR, G. A.; MOREIRA, J. C. F.; FREY, B. N. Preclinical and clinical evidence of antioxidant effects of antidepressant agents: implications for the pathophysiology of major depressive disorder. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2012.

BIESSELS, G. J.; GISPEN, W. H. The impact of diabetes on cognition: what can be learned from rodent models? **Neurobiology of Aging**, 26 de dezembro de 2005. Suplemento 1, p. 36 – 41.

BILICI, M.; EFE, H.; KOROGLU, M. A.; UYDU, H. A.; BEKAROGLU, M.; DEGER, O. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. **J Affect Disord.**, v. 6, p. 43 – 51, 2001.

BINFARÉ, R. W.; ROSA, A. O.; LOBATO, K. R.; SANTOS, A. R.; RODRIGUES, A. L. Ascorbic acid administration produces an antidepressant-like effect: evidence for the involvement of monoaminergic neurotransmission. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 33, n. 3, p. 530 – 540, 2009.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C.; WEISS, S. M.; MEYER, S. The effects of ethanol and diazepam on reactions to predatory odors. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 35, p. 775 – 780, 1990.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199 – 1200, 1958.

BORSINI, F.; PODHORNA, J.; MARAZZITI, D. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? **Psychopharmacology**, v. 163, p. 121–124, 2002.

BOUAYED, J.; RAMMAL, H.; SOULIMANI, R. Oxidative stress and anxiety relationship and cellular pathways. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 2, p. 63 – 67, 2009.

BOURIN, M. Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective. **Dialogues Clin Neurosci.**, v. 17, p. 295 – 303, 2015.

BREMNER, J. D.; VYTHILINGAM M.; VERMETTEN, E. et al. Reduced volume of orbitofrontal cortex in major depression. **Biological Psychiatry**, v. 51, p. 273 – 279, 2002.

BROWN, E. S.; VARGHESE, F. P.; MC EWEN, B. S.; Association of depression with medical illness: does cortisol play a role? **Biol Psychiatry.**, v. 55, p. 1 – 9, 2004.

CAIAFFO, V.; OLIVEIRA, B. D. R.; DE SÁ, F. B.; NETO, J. E. Anti-inflammatory, antiapoptotic, and antioxidant activity of fluoxetine. **Pharma Res Per.**, v. 4, n. 3, 2016.

CALETTI, G.; OLGUINS, D. B.; PEDROLLO, E. F.; BARROS, H. M.; GOMEZ, R. Antidepressant effect of taurine in diabetic rats. **Amino Acids**, v. 43, n. 4, p. 1525 – 1533, 2012.

CAMPOS, A. C.; FOGAÇA, M. V.; AGUIAR, D. C.; GUIMARÃES, F. S. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, p. 101–111, 2013.

CAN, O. D.; OZTÜRK, Y.; OZKAY, U. D. Effects of insulin and St. John's wort treatments on anxiety, locomotory activity, depression, and active learning parameters of streptozotocin-diabetic rats. **Planta Med.**, v. 77, p. 1970 – 1976, 2011.

CASTILLO, A. R. G. L.; RECONDO, R.; ASBAHR, F. R.; MANFRO, G. G. Transtornos de ansiedade. **Rev Bras Psiquiatr.**, v. 22, p. 20 – 23, 2000.

CHEN, F. A.; WU, A. B.; CHEN, C. Y. The influence of treatments on the free radical scavenging activity of burdock and variations of its activity. **Food Chem.**, v. 86, p. 479 – 484, 2004.

CHHILLAR, R.; DHINGRA, D. Antidepressant-like activity of gallic acid in mice subjected to unpredictable chronic mild stress. **Fundam Clin Pharmacol.**, v. 27, n. 4, p. 409 – 418, agosto de 2012.

CHOUBEY, S.; VARUGHESE, L. R.; KUMAR, V.; BENIWAL, V. Medicinal importance of gallic acid and its ester derivatives: a patent review. **Pharm Pat Anal.**, v. 4, n. 4, p. 305 – 315, 2015.

CLAVIJO, M.; CARVALHO, J. J.; RIOS, M.; DE OLIVEIRA, I. R. Psychiatric disorders in patients with diabetes type 2 at medical care and training district of Rio Branco-Acre, Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 64, n. 3B, p. 807 – 813, 2006.

COLLINS, M. M.; CORCORAN, P.; PERRY, I. J. Anxiety and depression symptoms in patients with diabetes. **Diabetic Medicine**, v. 26, n. 2, p. 153 – 161, 2009.

CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacol Biochem Behav.**, v.13, p. 167 – 70, 1980.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, p. 238 – 245, 2002.

DA SILVA, D. I. C.; CARABELLI, B.; ISHII, D. K.; DE MORAIS, H. et al. Indoleamine-2,3-dioxygenase/kynurenine pathway as a potential pharmacological target to treat depression associated with diabetes. **Mol Neurobiol.** 15 de dezembro de 2015.

DADHEECH, G.; MISHRA, S.; GAUTAM, S.; SHARMA, P. Evaluation of antioxidant deficit in schizophrenia. **Indian J Psychiatry**, v. 50, p. 16 – 20, 2008.

DAL-PIZZOL, F.; KLAMT, F.; VIANNA, M. et al. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. **Neuroscience Letters**, v. 291, p. 179 – 182, 2000.

DE CARVALHO, V. F.; GUEDES, C. P.; GONÇALVES, P. L.; DE CÁSSIA, G. A. L. R. The role of hyperglycemia in the induction of oxidative stress and inflammatory process. **Nutrición Hospitalaria**, v. 27, n. 5, p. 1391 – 1398, 2012.

DE MORAIS, H.; DE SOUZA, C. P.; DA SILVA, L. M. et al. Increased oxidative stress in prefrontal cortex and hippocampus is related to depressive-like behavior in streptozotocin-diabetic rats. **Behav Brain Res.**, v. 258, p. 52 – 64, 1 de janeiro de 2014.

DESRUMAUX, C.; RISOLD, P. Y.; SCHROEDER, H. et al. Phospholipid transfer protein (PLTP) deficiency reduces brain vitamin E content and increases anxiety in mice. **The FASEB Journal**, v. 19, p. 296 – 297, 2005.

DIPNALL, J. F.; PASCO, J. A.; MEYER, D. et al. The association between dietary patterns, diabetes and depression. **J Affect Disord.** v. 174, p. 215 – 224, 2015.

DJORDJEVIC, J.; DJORDJEVIC, A.; ADZIC, M.; ELAKOVIC, I.; MATIC, G.; RADOJCI, M. B. Fluoxetine affects antioxidant system and promotes apoptotic signaling in Wistar rat liver. **Eur J Pharmacol.**, v. 659, p. 61 – 66, 2011.

EGEDE, L. E. & ELLIS, C. 2010. **Diabetes and depression: global perspectives**. Disponível em <[http://www.diabetesresearchclinicalpractice.com/article/S0168-8227\(10\)00047-1/pdf](http://www.diabetesresearchclinicalpractice.com/article/S0168-8227(10)00047-1/pdf)>. Acessado em 10 de setembro de 2016.

ENNACEUR, A.; CHAZOT, P. L. Preclinical animal anxiety research – flaws and prejudices. **Pharma Res Per.**, v. 4, n. 2, 2016.

ERENMEMISOGLU, A.; OZDOGAN, U. K.; SARAYMEN, R.; TUTUS, A. Effect of some antidepressants on glycaemia and insulin levels of normoglycaemic and alloxan-induced hyperglycaemic mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, n. 6, p. 741 – 743, 1999.

ESPEJO, E. F. Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus-maze in male mice. **Behavioural Brain Research**, v. 87, p. 233 – 238, 1997.

EVANS, J. L.; GOLDFINE, I. D.; MADDUX, B. A.; GRODSKY, G. M. Oxidative stress and stress activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. **Endocrine Reviews**, v. 23, p. 599 – 622, 2002.

FARDOUN, R. Z. The Use of Vitamin E in Type 2 Diabetes Mellitus. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 29, p. 135 – 148, 2007.

FAVA, M.; DAVIDISON, K. G. Definition and epidemiology of treatment-resistant depression. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 19, n. 2, p. 179-200, 1996.

GAMBETA, E.; DE SOUZA, C. P.; DE MORAIS, H.; ZANOVELI, J. M. Reestablishment of the hyperglycemia to the normal levels seems not to be essential to the anxiolytic-like effect induced by insulin. **Metab Brain Dis.** 25 de novembro de 2015.

GASPAROVIC, A. C.; LOVAKOVIC, T.; ZARKOVIC, N. Oxidative Stress and Antioxidants: Biological Response Modifiers of Oxidative Homeostasis in Cancer. **Periodicum Biologorum**, v. 112, n. 4, p. 433 – 439, 2010.

GAUTAM, M.; AGRAWAL, M.; GAUTAM, M.; SHARMA, P.; GAUTAM, A. S.; GAUTAM S. Role of antioxidants in generalised anxiety disorder and depression. **Indian Journal of Psychiatry**, v. 54, n. 3, p. 244 – 247, 2012.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circ Res.**, v. 107, n. 9, p. 1058-1070, 2010.

GOLDEN, S. H.; LAZO, M.; CARNETHON, M. et al. Examining a bidirectional association between depressive symptoms and diabetes. **JAMA**, v. 299, p. 2751 – 2759, 2008.

GOMEZ, R.; BARROS, H. M. Ethopharmacology of the antidepressant effect of clonazepam in diabetic rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Porto Alegre, v. 66, n. 2, p. 329 – 335, 2000.

GRAGNOLI, C. Hypothesis of the neuroendocrine cortisol pathway gene role in the comorbidity of depression, type 2 diabetes, and metabolic syndrome. **Appl Clin Genet.**, v. 7, p. 43 – 53, 2014.

GRIEBEL, G.; RODGERS, R. J.; PERRAULT, G.; SANGER, D. J. Risk assessment behaviour: evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the rat elevated plus-maze test. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 57, p. 817 – 827, 1997.

GRIGSBY, A. B.; ANDERSON, R. J.; FREEDLAND, K. E. et al. Prevalence of anxiety in adults with diabetes: a systematic review. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 53, n. 6, p. 1053 – 1060, dezembro de 2002.

GUPTA, D.; KURHE, Y.; RADHAKRISHNAN, M. Antidepressant effects of insulin in streptozotocin induced diabetic mice: Modulation of brain serotonin system. **Physiol Behav.**, v. 129, p. 73 – 78, 22 de abril de 2014.

HAIDER, S.; AHMED, S.; TABASSUM et al. Streptozotocin-induced insulin deficiency leads to development of behavioral deficits in rats. **Acta Neurol. Belg.**, v. 113, p. 35 –41, 2012.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging**, v. 18, p. 685 – 716, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford Science Publications, Oxford, 1999.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear' motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 327, p. 1 – 5, 1984.

HERKEN, H.; GUREL, A.; SELEK, S. et al. Adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase, and xanthine oxidase in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. **Arch Med Res.**, v. 38, p. 247 – 252, 2007.

HO, N.; BALU, D. T.; HILARIO, M. R. F.; BLENDY, J. A.; LUCKI, I. Depressive phenotypes evoked by experimental diabetes are reversed by insulin. **Physiology & Behavior**, v. 105, n. 3, p. 702 – 708, 2012.

HUETHER, G. & SCHUFF-WERNER, P. Platelet serotonin acts as a locally releasable antioxidant. **Adv Exp Med Biol.**, v. 398, p. 299 – 306, 1996.

IDF (*International Diabetes Federation*) - Federação Internacional do Diabetes. **About diabetes**. 2015. Disponível em <<http://www.idf.org/about-diabetes>>. Acesso em 30/09/2016.

IDF (*International Diabetes Federation*) - Federação Internacional do Diabetes. **IDF diabetes atlas - 7th edition**. 2015. Disponível em <<http://www.diabetesatlas.org/>>. Acesso em 30/09/2016.

INNOS, J.; KOIDO, K.; PHILIPS, M. A.; VASAR, E. Limbic system associated membrane protein as a potential target for neuropsychiatric disorders. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, p. 32, 2013.

JIANG, Z. Y.; WOOLLARD, A. C.; WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v. 26, p. 853 – 856, 1991.

KADE, I. J.; ROCHA, J. B. T. Gallic Acid Modulates Cerebral Oxidative Stress Conditions and Activities of Enzyme-Dependent Signaling Systems in Streptozotocin-Treated Rats. **Neurochem Res.**, v. 38, p. 761 – 771, 2013.

KAMEI, J.; MIYATA, S.; MORITA, K.; SAITOH, A.; TAKEDA, H. Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on immobility time in the tail suspension test in streptozotocin-induced diabetic mice. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 75, n. 2, p. 247 – 254, 2003.

KANAZAWA, L. K. S.; VECCHIA, D. D.; WENDLER, E. M. et al. Quercetin reduces manic-like behavior and brain oxidative stress induced by paradoxical sleep deprivation in mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 99, p. 79 – 86, 2016.

KHANZODE, S. D.; DAKHALE, G. N.; KHANZODE. S. S.; SAOJI, A.; PALASODKAR, R. Oxidative damage and major depression: the potential antioxidant action of selective serotonin re-uptake inhibitors. **Redox Rep.**, v. 8, p. 365 – 370, 2003.

KSHAMA, D.; HRISHIKESHAVAN, H. J.; SHANBHOGUE, R. Modulation of baseline behavior in rats by putative serotonergic agents in three ethoexperimental paradigms. **Behav Neural Biol.**, v. 54, p. 234 – 253, 1990.

KURHE, Y.; MAHESH, R. Ondansetron attenuates co-morbid depression and anxiety associated with obesity by inhibiting the biochemical alterations and improving serotonergic neurotransmission. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 136, p. 107 – 116, setembro de 2015.

LATHA, C. R.; DAISY, P. Insulin-secretagogue, antihyperlipidemic and other protective effects of gallic acid isolated from *Terminalia bellerica* Roxb. in streptozotocin-induced diabetic rats. **Chemical-biological Interactions**. India, v. 189, n. 1-2, p. 112 – 118, 2011.

LIN, E. H.; VON, M. K.; ALONSO, J. et al. Mental disorders among persons with diabetes-results from the World Mental Health Surveys. **J Psychosom Res.**, v. 65, p. 571 – 580, 2008.

LITTLE, A. Treatment-resistant depression. **American Family Physician**, v. 80, n. 2, p. 167-172, 2009.

LOBATO, K. R., CARDOSO, C. C., BINFARÉ, R. W., BUDNI, J. et al. Alpha-tocopherol administration produces an antidepressant-like effect in predictive animal models of depression. **Behavioural Brain Research**, v. 209, n. 2, p. 249 – 259, 2010.

LU, Z.; NIE, G.; BELTON, P. S.; TANG, H.; ZHAO, B. Structure-activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. **Neurochem Int.**, v. 48, n. 4, p. 263 – 274, março de 2006.

MADRIGAL, J. L.; GARCÍA-BUENO, B.; CASO, J. R.; PÉREZ-NIEVAS, B. G.; LEZA, J. C. Stress-induced oxidative changes in brain. **CNS & Neurological Disorder – Drug Targets**, v. 5, n. 5, p. 561 – 568, outubro de 2006.

MAES, M.; DE VOS, N.; PIOLI, R.; DEMEDTS, P.; WAUTERS, A.; NEELS, H.; et al. A. Lower serum vitamin E concentrations in major depression. **J Affect Disord.**, v. 58, n. 3, p. 241 – 246, 2000.

MAGARIÑOS, A. M.; MCEWEN, B. S. Experimental diabetes in rats causes hippocampal dendritic and synaptic reorganization and increased glucocorticoid reactivity to stress. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 97, p. 11056 – 11061, 2000.

MAIA, A. C.; BRAGA, A. A.; PAES, F.; MACHADO, S.; NARDI, A. E.; SILVA, A. C. Psychiatric comorbidity in diabetes type 1: a cross-sectional observational study. **Rev Assoc Med Bras.**, v. 60, n. 1, p. 59 – 62, 2014.

MANSOURI, M. T.; NAGHIZADEH, B.; GHORBANZADEH, B.; FARBOOD, Y.; SARKAKI, A.; BAVARSAD K. Gallic acid prevents memory deficits and oxidative stress induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 111, p. 90 – 96, outubro de 2013.

MANSOURI, M. T.; SOLTANI, M.; NAGHIZADEH, B.; FARBOOD, B. Y.; MASHAK, A.; SARKAKI, A. A possible mechanism for the anxiolytic-like effect of gallic acid in the rat elevated plus maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 117, p. 40 – 46, 2014.

MICHEL, T. M.; PÜLSCHEN, D.; THOME, J. The role of oxidative stress in depressive disorders. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 36, p. 5890 – 5899, 2012.

MIR., K.; MALIK, I.; SHEHZADI, A. Prevalence of comorbid depression in diabetic population. **J Ayub Med Coll.**, v. 27, n. 1, p. 99 – 101, 2015.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K.; Estimation of antiradical properties of using DPPH assay: A critical review and results. **Food Chem.**, v. 130, p. 1036 – 1043, 2012.

MOGHADAS, M.; EDALATMANESH, M. A.; ROBATI, R. Histopathological Analysis from Gallic Acid Administration on Hippocampal Cell Density, Depression, and Anxiety Related Behaviors in A Trimethyltin Intoxication Model. **Cell Journal**, v. 17, n. 4, p. 659 – 667, 2016.

MORETTI, M.; COLLA, A.; BALEN, G. O. et al. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **J Psychiatr Res.**, v. 46, p. 331 – 340, 2012.

NAUDI, A.; JOVE, M.; AYALA, V.; CASSANYE, A.; SERRANO, J. et al. Cellular dysfunction in diabetes as maladaptive response to mitochondrial oxidative stress. **Experimental Diabetes Research**, 2012.

NICOLAU, J.; RIVERA, R.; FRANCÉS, C.; CHACÁRTEGUI, B.; MASMIQUEL, L. Treatment of depression in type 2 diabetic patients: Effects on depressive symptoms, quality of life and metabolic control. **Diabetes Research and Clinical Practice**, 22 de junho de 2013.

NOVÍO, S.; NUNEZ, M. J.; AMIGO, G.; FREIRE-GARABAL, M. Effects of fluoxetine on the oxidative status of peripheral blood leucocytes of restraintstressed mice. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.**, v. 109, p. 365 – 371, 2011.

PARK, C. H.; LEE, J. Y.; KIM, M. Y. et al. Oligonol, a low-molecular-weight polyphenol derived from lychee fruit, protects the pancreas from apoptosis and proliferation via oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. **Food & Function**, v. 7, n. 7, p. 3056-3063, julho de 2016.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E. & BRILEY, M. Validation of open : closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149 – 167, 1985.

PITOCCO, D.; ZACCARDI, F.; DI STASIO, E.; ROMITELLI, F.; SANTINI, S. A.; ZUPPI, C.; GHIRLANDA, G. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. **Rev Diabet Stud.**, v. 7, p. 15 – 25, 2010.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; BLAVET, N.; DENIEL, M.; JALFRE, M. Immobility induced by forced swimming in rats: effects of agents wich modify central catecholamine and serotonin activity. **European Journal of Pharmacology**, v. 57, n. 2-3, p. 201 – 210, 1979.

PRINCE, S. M.; KUMAR, M. R.; SELVAKUMARI, C. J. Effects of gallic acid on brain lipid peroxide and lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. **J Biochem Molecular Toxicology**, v. 25, p. 101 – 107, 2010.

PUNITHAVATHI, V. R.; PRINCE, P. S.; KUMAR, R.; SELVAKUMARI, J. Antihyperglycaemic, antilipid peroxidative and antioxidant effects of gallic acid on streptozotocin induced diabetic Wistar rats. **Eur J Pharmacol.**, v. 650, n. 1, p. 465 – 471, 2011.

RADENKOVIĆ, M.; STOJANOVIĆ, M.; PROSTRAN, M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 78, p. 13 – 31, 2016.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; GARDNER, P. Controle da glicemia e tratamento da diabetes *mellitus*. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 7^a ed., 2012. p. 372-377.

REDIVO, D. D. B.; SCHREIBERA, A. K.; ADAM, E. R. Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid treatment over mechanical allodynia and depressive-like behavior associated with experimental diabetes. **Behavioural Brain Research**, v. 298, p. 57 – 64, 2015.

RENN, B. N.; FELICIANO, L.; SEGAL, D. L. The bidirectional relationship of depression and diabetes: a systematic review. **Clinical Psychology Review**, v. 31, n. 8, p. 1239 – 1246, 2011.

REVSIN, Y. DE KLOET, E. R. When glucocorticoids change from protective to harmful. Lessons from a type 1 diabetes animal model. **Medicina (B Aires)**, v. 69, p. 353 – 358, 2009.

ROBERT, G.; DRAPIER, D.; BENTUÉ-FERRER, D.; RENAULT, A.; REYMANN, J-M. Acute and chronic anxiogenic-like response to fluoxetine in rats in the elevated plus-maze: Modulation by stressful handling. **Behavioural Brain Research**, v. 220, p. 344 – 348, 2011.

ROBERT, S. M.; OGUNRINU-BABARINDE, T.; HOLT, K. T.; SONTHEIMER, H. Role of glutamate transporters in redox homeostasis of the brain. **Neurochem Int.**, v. 73, p. 181 – 191, 2014.

RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 289 – 304, 1997.

ROWLAND, N. E.; BELLUSH, L. L. Diabetes mellitus: stress, neurochemistry and behavior. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 13, p. 199 – 206, 1989.

ROY, T. & LLOYD, C. E. Epidemiology of depression and diabetes: a systematic review. **Journal of Affective Disorders**, v. 142, p.8 – 21, 2012.

RUBIN, R. R.; CIECHANOWSKI P.; EGEDE, L. E.; LIN, E. H.; LUSTMAN, P. J. Recognizing and treating depression in patients with diabetes. **Current Diabetes Reports**, v. 4, n. 2, p. 119 – 125, 2004.

RUSTAD, J. K.; MUSSELMAN, D. L.; NEMEROFF, C. B. The relationship of depression and diabetes: pathophysiological and treatment implications. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 9, p. 1276 – 1286, 2011.

SANCHEZ, C.; MEIER, E. Behavioural profiles of SSRIs in animal models of depression, anxiety and aggression. Are they all alike? **Psychopharmacology**, v. 129, p. 197 – 205, 1997.

SAVITZ, J.; DREVETS, W. C. Bipolar and major depressive disorder: neuroimaging the developmental-degenerative divide. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 33, p. 699 – 771, 2009.

SCHOEVERS, R. A.; VAN, H. L.; KOPPELMANS, V.; KOOL, S.; DEKKER, J. J. Managing the patient with comorbid depression and an anxiety disorder. **Drugs**, v. 68, p. 1621 – 1623, 2008.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 192 – 205, 1968.

SHARMA, P.; BHARDWAJ, P.; SINGH, R. Administration of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium bifidum* ameliorated hyperglycemia, dyslipidemia, and oxidative stress in diabetic rats. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 7, n. 102, 2016.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp Physiol.**, v. 82, n. 2, p. 291-295, março de 1997.

SILVA, M. T.; ALVES, C. R.; SANTAREM, E. M. Anxiogenic-like effect of acute and chronic fluoxetine on rats tested on the elevated plus-maze. **Braz J Med Biol Res.**, v. 32, p. 333 – 339, 1999.

SILVA, R. C. B.; BRANDAO, M. L. Acute and chronic effects of gepirone and fluoxetine in rats tested in the elevated plus-maze: an ethological analysis. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 65, p. 209 – 216, 2000.

SINGH, P.; RAHUL, M. K.; VIJAY, T.; SUDHAKAR, P. Anxiolytic Effect of Chronic Administration of Gallic acid in Rats. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, V. 3, n. 7, p. 101 – 104, julho de 2013.

SORREGOTTI, T.; GOMES, J. M.; RICO, J. L.; RODGERS, R. J.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Ethopharmacological analysis of the open elevated plus-maze in mice, **Behavioural Brain Research**, 2013.

SPIS, K.; PIETSCHMANN, P.; PRAGER, R. A program to reduce onset distresses in unselected type I diabetic patients: effects on psychological variables and metabolic control. **European Journal of Endocrinology**, v. 132, p. 580 – 586, 1995.

STANELY P. M. P.; KUMAR M. R.; SELVAKUMARI, C. J. Effects of gallic acid on brain lipid peroxide and lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. **J Biochem Mol Toxicol.**, v. 25, n. 2, p. 101 – 107, 2011.

STARCEVIC, V. Benzodiazepines for anxiety disorders: maximising the benefits and minimising the risks. **Advances in Psychiatric Treatment**, v. 18, p. 250 – 258, 2012.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in b cells of the rat pancreas. **Physiological Research**, v. 50, p. 536 – 546, 2001.

TSUBOI, H.; TATSUMI, A.; YAMAMOTO, K.; KOBAYASHI, F.; SHIMOI, K.; KINAE, N. Possible connections among job stress, depressive symptoms, lipid modulation and antioxidants. **Journal of Affective Disorders**, v. 91, p. 63 – 70, 2006.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 39, n. 1, p. 44 – 84, 2007.

VERMA, S.; SINGH, A.; MISHRA, A. Gallic acid: molecular rival of cancer. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 35, n. 3, p. 473 – 485, maio de 2013.

VICENTE, M. A.; ZANGROSSI, H. J. R. Involvement of 5-HT_{2C} and 5-HT_{1A} receptors of the basolateral nucleus of the amygdala in the anxiolytic effect of chronic antidepressant treatment. **Neuropharmacology**, v. 79, p. 127 – 135, abril de 2014.

WANG, X.; MICHAELIS, E. K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 30, p. 2 – 12, 2010.

WAYHS, C. A.; MANFREDINI, V.; SITTA, A. et al. Protein and lipid oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test: the insulin and clonazepam effect. **Metabolic Brain Disease**, v. 25, n. 3, p. 297 – 304, 2010.

WRIGHTEN, S. A.; PIROLI, G. G.; GRILLO, C. A.; REAGAN, L. P. A look inside the diabetic brain: Contributors to diabetes-induced brain aging. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1792, n. 5, p. 444 – 453, 2008.

ZANOVELI, J. M.; DE MORAIS, H.; DA SILVA, I. C. D. et al. Depression associated with diabetes: from pathophysiology to treatment. *Current Diabetes Reviews*, v. 11, p. 11 – 14, 2016.